



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento de métodos para determinação fluorimétrica de
vitamina B₂ em multivitamínicos, cervejas e vinhos usando pontos
de carbono obtidos a partir de suco de limão e cebola**

Severino Sílvio do Monte Filho

João Pessoa - PB - Brasil
Abril de 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



TESE DE DOUTORADO

Desenvolvimento de métodos para determinação fluorimétrica de vitamina B₂ em multivitamínicos, cervejas e vinhos usando pontos de carbono obtidos a partir de suco de limão e cebola

Severino Sílvio do Monte Filho

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Coorientador: Dr. Stéfani Iury Evangelista de Andrade

João Pessoa - PB - Brasil
Abril de 2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F481d Filho, Severino Silvio do Monte.

Desenvolvimento de métodos para determinação fluorimétrica de vitamina B2 em multivitamínicos, cervejas e vinhos usando pontos de carbono obtidos a partir de suco de limão e cebola / Severino Silvio do Monte Filho. - João Pessoa, 2019.

148 f. : il.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.

Coorientação: Stéfani Iury Evangelista de Andrade.

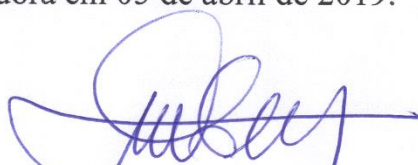
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Nanopartículas de carbono. 2. Fluorescência molecular. 3. Riboflavina. 4. Vinhos. 5. Cervejas. 6. Micro-ondas. I. Araújo, Mário César Ugulino de. II. Andrade, Stéfani Iury Evangelista de. III. Título.

UFPB/CCEN

Desenvolvimento de métodos para determinação fluorimétrica de Vitamina B2 em multivitamínicos, cervejas e vinhos usando pontos de Carbono obtidos a partir de suco de limão e cebola.

Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Severino Silvio do Monte Filho e aprovada pela banca examinadora em 05 de abril de 2019.



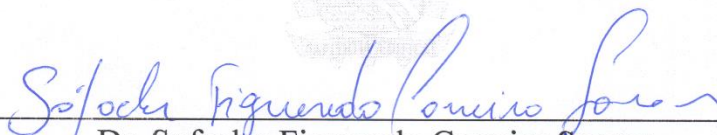
Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



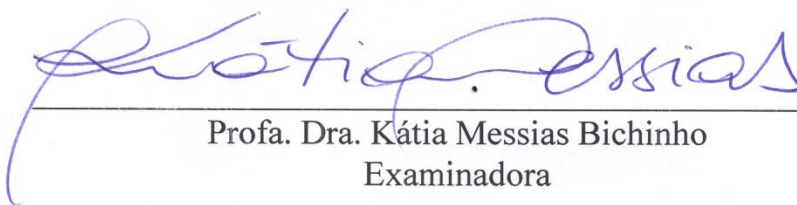
Dr. Stefani Iury Evangelista de Andrade
2º. Orientador



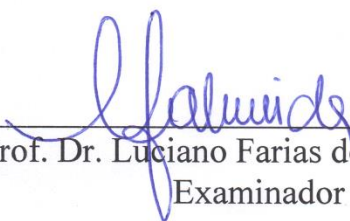
Prof. Dr. Marcelo Batista de Lima
Examinador



Dr. Sofacles Figueredo Carreiro Soares
Examinador



Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador

Dedicatória e agradecimentos

À minha amada esposa e companheira de todas as horas Raquel Cabral, dedico este trabalho.

Agradeço à tão criteriosa orientação e amizade dos Profs. Mário Ugulino e Stéfani Iury, primordiais ao andamento e conclusão desse trabalho.

Ao empenho do amigo e Prof. Marcelo Batista por me encaminhar nesta pesquisa e oferecer as contribuições cruciais para o sucesso do mesmo, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Sófacles que com sua amizade, conhecimento e exemplo de vida, tanto tem ajudado a todos à sua volta, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a todos que compõem o LAQA pelo companheirismo.

Agradeço aos componentes dos laboratórios da UFPB (LSR, LTA, LACOM), que ajudaram com seu precioso tempo a realizar análises complementares tão importantes para a concretização desta pesquisa.

À minha mãe, meus irmãos e irmã, que comigo, sempre experimentam o conforto do reencontro, também ofereço este trabalho de pesquisa.

Em memória aos meus familiares e amigos que já não se encontram nesse plano, porém se fazem presentes devido à sua influência na pessoa que me tornei, compartilho este trabalho.

Lista de figuras

Figura 1 - Representação de abordagens para obtenção de PC, a partir de precursores carbonáceos e algumas técnicas utilizadas para os métodos agregadores (bottom-up) e desagregadores (top-down).....	24
Figura 2 - Etapas de síntese de PC a partir de irradiação com micro-ondas. Adaptada de He et al., (2017).	28
Figura 3 - Ilustração de uma das possíveis etapas da síntese de PC a partir de um bioprecurso. Adaptada de Singh, Kumar, Singh (2016)......	34
Figura 4 - Mecanismo envolvido na composição da FL dos PC Armadilha emissiva (A, A1), confinamento quântico (A1), Fluoróforos incorporados (B), centros de emissão individuais (B1), (Ilustração adaptada de Cayuela et al., 2016; Mondal et al., 2016).	35
Figura 5 - Imagem de espectro FTIR dos NSPCs, na qual se verifica a presença de alguns grupos funcionais na superfície dos PCs sintetizados a partir de um tipo de gelatina, a 280°C. Adaptada de Vaz et al., (2015).	40
Figura 6 - Espectro de absorção molecular, correspondente aos PCs derivados de um tipo de gelatina comercial, obtidos a 280 °C. A primeira banda (280 nm) correspondente a transições eletrônicas do tipo $\pi-\pi^*$ (relativo a C=C dos anéis aromáticos), e a segunda (325 nm), do tipo $n-\pi^*$, (correspondente a C=O e C-O). Adaptada de Vaz et al., (2015).	41
Figura 7 - Espectros de fluorescência de PCs produzidos a partir da carbonização hidrotérmica da gelatina a 280 °C, em diferentes comprimentos de onda de excitação, a maior intensidade de fluorescência ocorre com 350 nm de excitação. Adaptado de Vaz et al., (2015).....	42
Figura 8 - Espectro de emissão de fluorescência raios X de uma liga metálica, com destaque aos componentes elementares prata, níquel, cobre e cromo, obtido por dispersão de comprimento de onda. Adaptado de Ewing (1972).	44
Figura 9 - Difratoograma de DRX dos PC produzidos a partir da banana, com um pico em 21,1°, indicando o espaçamento de 0,42 nm entre as camadas do material, superior ao espaçamento entre as camadas do grafite (0,33 nm), indicando baixa cristalinidade dos pontos de carbono, devida aos grupos funcionais superficiais. Adaptada de: De e Karak, 2013.	46
Figura 10 - Imagem de TEM de um PC de dimensão aproximada de 6 nm, cujos planos do carbono gráfico medindo décimos de nanômetros são claramente visíveis, em comparação com a barra de escala que corresponde a 2 nm, Figura adaptada de Jelinek, Ben-Gurion, Sheva, (2017). .	47
Figura 11 - Representação do tipo <i>ball-and-stick</i> da riboflavina (RF) ou 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol) isoaloxazina. Seu anel central e simétrico (pirazina) cujas posições C _{4a} e N ₅ constituem os principais responsáveis pela atividade redox da molécula. No detalhe da composição da RF, a	

Isoaloxazina, que é anfotérica, e abaixo, observa-se cadeia ribitol, de onde vem o termo riboflavina. Figura adaptada de Mack, Grill (2006).	50
Figura 12 - Representação do espectro de absorção da RF (7 mg L ⁻¹ , —), com máximos em 222 (a), 266 (b), 373 (c) e 445 nm (d), e sobreposição aos espectros da tiamina (13 mg.L ⁻¹ , —), niacina (15 mg L ⁻¹ , —), cianocobalamina (0,5 mg L ⁻¹ , —) e piridoxina (11 mg L ⁻¹ , —), (Adaptado de López-de-Alba et al., 2006; Proinsias, Giedyk, Gryko, 2013).	52
Figura 13 - Representação gráfica da distribuição de intensidade de fluorescência da RF, com três áreas de intensa fluorescência quando excitada (λ_{ex}) a 270, 370, e 450 nm, apresentando um máximo de emissão a (λ_{em}) de 525 nm (Adaptado de Hui et al., 2016).	52
Figura 14 – Degradação de uma solução 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de RF e em função do tempo de exposição à radiação UV. Fonte: Ahmad et al., (2004).	53
Figura 15 - Representação da degradação da RF em meio básico, sob luz UV (lado esquerdo), e a representação do espectro de emissão da lumiflavina em comparação com o da RF, excitadas em 340 nm, onde apesar de apresentarem uma semelhança em termos de máximo de fluorescência, a lumiflavina se destaca pelo “ombro”, no comprimento de onda de aproximadamente 450 nm, ausente na RF (lado direito), adaptado de Wang et al., (2015a).	54
Figura 16 - Influência do pH sobre a fluorescência da RF em soluções aquosas. Pode-se alcançar valores maiores de intensidade de fluorescência, mantendo o pH tamponado próximo da neutralidade (região cinza do gráfico), e conforme o pH vai aumentando, o decréscimo da intensidade de fluorescência é considerável (adaptado de Scott et al., 1946).	55
Figura 17 - Representação gráfica do mecanismo de redução eletroquímica da RF em meio ácido, sua forma reduzida é conhecida como leucoflavina (Adaptada de Brezo et al., 2015).	65
Figura 18 - Aparelho de análise automática introduzido por Skeggs (1957). O componente no destaque (a) é uma mesa giratória de amostragem, na qual as amostras seriam depositadas em pequenos recipientes de vidro, com fundo interno cônico (b), a frequência analítica está indicada (c). Imagem adaptada do sítio www.chemheritage.org .	70
Figura 19 - Diagrama de um sistema automático para determinação espectrofotométrica de Riboflavina. Os retângulos representam um injetor proporcional, e A, soluções de referência ou de amostra; L ₁ e L ₂ , alças de amostragem de 250 µL, R reagente (AgNO ₃), C ₁ e C ₂ , solução de KNO ₃ , transportador da amostra e do reagente, E, espectrofotômetro (520 nm), X, ponto de confluência, B, reator helicoidal, D, descarte, as setas indicam o movimento da peça em funcionamento. Ilustração adaptada de Aniceto, et al., (2000).	71
Figura 20 - Diagrama esquemático do dispositivo FIA com destaques para sensor de fibra óptica, fonte de luz (FL) feixe de fibras bifurcadas (FFB) célula de fluxo contínuo (CFC), tubo fotomultiplicador (TFM), bomba peristáltica (BP); tubo por onde a amostra (A) é injetada no fluido transportador, válvula (V) e o sensor de fibra ótica (SFO), adaptado de Li et al., (2000a).	72

- Figura 21 - Esquema ilustrativo de uma montagem típica do FBA. (1) recipientes para soluções estoque (2) sistema de propulsão por bomba peristáltica, (3) válvulas solenoides, (4) câmara de mistura ou reação, (5) agitador magnético, (6) acionador de válvulas, (7) computador, (8) sistema de detecção, (9) recipiente para descarte, (10) tubos flexíveis, adaptado de Diniz et al., (2012). 73
- Figura 22 - Diagrama esquemático da síntese em etapa única via microondas dos NSPCs a partir de biomassa de limão e cebola em meio amoniacal, seguido de filtração (cerca de 1h) e centrifugação por 30 minutos, diálise por 24 horas (1 KDa), secagem por 6h a 40°C e diluição. Excitado em 380 nm, e fluorescência decrescente com o aumento de concentração da RF. ... 84
- Figura 23 - Imagem do sistema automático FBA utilizado. (a) câmara de mistura, (b) espectrofluorímetro portátil, (c) LED ultravioleta acoplado ao FBA, (d) agitador magnético portátil, (e) válvulas solenoides, (f) computador, (g) bomba peristáltica, (h) acionador e interface. No destaque, as setas tracejadas indicam o ângulo de 90° entre o LED e o detector de fluorescência, (i) LED ultravioleta, (j) dissipador de calor. 88
- Figura 24 - Diagrama esquemático em dois planos distintos (superior e frontal), do sistema automático fluxo-batelada proposto. BP: bomba peristáltica, V: válvulas solenoides, CM: câmara de mistura, J: Janelas de quartzo; AM: agitador magnético, BM: barra magnética. 89
- Figura 25 - Esquema representativo dos tempos de acionamento das válvulas referentes às sete etapas para medida em triplicata dos padrões de RF (0,025 a 0,600 mg_L⁻¹), com o FBA proposto, indicando a adição de água (1), de NSPCs/tampão (2), padrões de RF (3) agitação (5), aquisição de espectros (6), descarte (7) e a limpeza dos canais em duplicata (representada pelo ícone 🔄) entre cada sequência. 91
- Figura 26 - Esquema representativo dos tempos de acionamento das válvulas referentes às sete etapas para medida em triplicata (destaque no final) de cada adição do padrão RF (0,1 a 0,6 mg_L⁻¹), no processo de construção da curva de calibração com o FBA proposto, indicando a limpeza dos canais em duplicata (representada pelo ícone 🔄) entre cada sequência. 92
- Figura 27 - Interface do programa de gerenciamento do estudo das vazões individuais em cada linha de fluxo. 94
- Figura 28 - Interface do programa de controle do sistema FBA proposto, dividida de acordo com os procedimentos atribuídos em virtude do método proposto. Do lado esquerdo, pode ser visto os botões de início do processo ou limpeza dos canais, com as devidas configurações. No centro, o controle adição dos líquidos e suas respectivas válvulas, e do lado direito, o controle do espectrofluorímetro portátil. 95
- Figura 29 - Rendimentos quânticos dos NSPCs obtidos, (a) em função de diferentes proporções entre sucos de limão e cebola, com o melhor valor na proporção de 20:2; (b) em função do tempo de irradiação com microondas, com o melhor rendimento em 6 minutos. 99
- Figura 30 - Espectro FTIR, obtido a partir dos NSPCs, onde se verifica a possível presença de alguns importantes grupos funcionais como, amino, hidroxila e sulfito, entre outros. 100

Figura 31 - Diagrama do Padrão de DRX dos NSPCs, com um pico em torno de 23°, indicando baixa cristalinidade dos pontos de carbono, possivelmente devida aos grupos funcionais superficiais.	101
Figura 32 - (A) Imagem de TEM dos NSPCs de dimensão aproximada de 6 nm e morfologia quase esférica, em comparação com a barra de escala que corresponde a 10 nm; (B) Gráfico em histograma representando a dispersão dimensional dos NSPCs, entre 4,23 e 8,22 nm, indicando uma distribuição normal, e o tamanho médio de 6,15 nm.....	102
Figura 33 - Imagem de TEM de um NSPCs com a visualização dos planos do carbono grafítico medindo décimos de nanômetros, normalmente mais afastados do que o grafite, reforçando a caracterização da possível dopagem do mesmo com grupos funcionais diversos.....	102
Figura 34 - Imagem de varredura do espectro de emissão de fluorescência em função do comprimento de onda de excitação, observando-se a 340 nm, a ocorrência da maior intensidade (A); espectro de absorção UV-vis dos NSPCs (linha em preto) e picos de excitação (340 nm, linha vermelha) e emissão (425 nm, linha azul), com o destaque para a fluorescência azulada dos NSPCs a 365 nm, no canto superior direito da figura B.....	103
Figura 35 - (A) Os espectros de sobreposição espectral (cinza), da absorção de riboflavina (azul) e emissão dos NSPCs (vermelho). (B) Espectros de fluorescência de PCs na presença de diferentes quantidades de riboflavina, $\lambda_{ex} = 380\text{nm}$. (C) A eficiência do processo de FRET como uma função da concentração de riboflavina com o comprimento de onda de excitação dos NSPCs/riboflavina variando de 340 a 400 nm.	104
Figura 36 - representação da variação do EFRET do sistema RF/NSPCs em função do pH (a) e da concentração dos NSPCs (b), indicando os maiores valores em pH 6,9 e 98,6 mg_L^{-1} de NSPCs.	106
Figura 37 - Relação entre o volume de solução tampão e seu respectivo EFRET%, contra solução contendo 0,5 mg_L^{-1} de RF, com o melhor resultado em 250 μL	107
Figura 38 - Teste de seletividade para o método envolvendo o sistema RF/NSPCs na determinação da vitamina em multivitamínicos e bebidas, frente a possíveis interferentes (100 $\mu\text{g_mL}^{-1}$) para a EFRET%. Nenhuma alteração significativa foi observada.	107
Figura 39 - Curva analítica para a determinação de RF em suplementos multivitamínicos, baseada na concentração de RF <i>versus</i> EFRET%.....	108
Figura 40 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.	109
Figura 41 - Representação da aquisição dos espectros de fluorescência dos NSPCs excitados em 380nm, obtidos a partir do sistema FBA proposto, em presença de soluções de RF de concentrações variadas (0,0 a 0,6 mg_L^{-1}). Destacando-se a diminuição da intensidade de fluorescência do nanomaterial (440 nm), com o aumento da concentração da RF.	113
Figura 42 - Curva analítica EFRET(%) dos NSPCs <i>versus</i> concentração, para a determinação de RF em vinhos e cervejas (pH 6,9).	113

Figura 43 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.	114
Figura 44 - Curvas de adição de padrão para uma amostra de vinho (a) e uma de cerveja (b), com EFRET(%) dos NSPCs <i>versus</i> volume de adição de solução padrão de RF, utilizadas na determinação automática de RF.	115
Figura 45 - Curvas emissão de soluções alcoólica a 95 % (v v ⁻¹) (RF/EtOH) e aquosa em tampão fosfato 0,03 mol L ⁻¹ (pH 7,0), (RF/H ₂ O) de RF de mesma concentração 2,5 mg L ⁻¹ evidenciando um aumento significativo na emissão quando se trata de solução.....	116
Figura 46 – gráfico da intensidade de fluorescência de dispersão dos NSPCs utilizados neste trabalho em função do tempo de armazenagem a uma temperatura de cerca de 4 °C e ao abrigo da luz.	118

Lista de tabelas

Tabela 1 - Algumas características básicas da fluorescência dos PCs exploradas em aplicações analíticas.....	31
Tabela 2 - Recomendações dietéticas diárias para a RF.....	51
Tabela 3 - Composição nutricional dos comprimidos vitamínicos e minerais utilizados como amostras.....	80
Tabela 4 – Teor alcoólico das cervejas utilizadas no presente trabalho (informação dos rótulos).	81
Tabela 5 - Composição elementar dos NSPCs utilizados no método proposto.....	100
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.	109
Tabela 7 -Resultados obtidos da determinação da concentração de riboflavina em suplementos multivitamínicos e minerais usando o método proposto e o método de referência (n=3).	110
Tabela 8 -Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.	110
Tabela 9 - Parâmetros de desempenho para o método proposto.	111
Tabela 10 - Teste de recuperação para a RF nas amostras de suplementos vitamínicos e minerais (n = 3).....	111
Tabela 11 - Vazões médias dos canais individuais das soluções.	112
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.	114
Tabela 13 - Resultados obtidos da determinação da concentração de riboflavina em vinhos e cervejas usando o método proposto e o método de referência (n=3).	117
Tabela 14 - Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.....	117
Tabela 15 - Características de desempenho para o método proposto.....	118

Sumário

Lista de figuras	4
Lista de tabelas	9
Sumário.....	10
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Caracterização da problemática.....	16
1.2 Objetivos e metas	19
1.2.1 Objetivos.....	19
1.2.2 Metas	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Nanomateriais e nanotecnologia	21
2.2 Pontos de carbono (PCs)	22
2.3 Síntese de PCs via irradiação por micro-ondas	26
2.4 Passivação e Funcionalização superficial de PCs	28
2.5 Propriedades ópticas dos PCs.....	30
2.5.1 Fluorescência	30
2.5.2 Considerações sobre o mecanismo de fluorescência dos PCs.....	33
2.5.3 O Rendimento quântico de fluorescência dos PCs	36
2.5.4 Absorção molecular	37
2.6 O princípio FRET	38
2.7 Caracterização dos PCs	39
2.7.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	40
2.7.2 Espectroscopia de absorção molecular	41
2.7.3 Espectroscopia de fluorescência.....	41
2.7.4 Espectroscopia de fluorescência de raios X	42
2.3.1.1 Espectroscopia de raios X por dispersão de comprimento de onda.....	44
2.3.1.2 Espectroscopia de difração de raios X.....	45
2.7.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	46

2.8	A importância das vitaminas	47
2.8.1	Considerações acerca da riboflavina	49
2.8.2	Estabilidade de soluções de RF	53
2.9	Determinação de riboflavina em suplementos vitamínicos e bebidas.....	55
2.9.1	Método microbiológico	56
2.9.2	Cromatografia líquida de alto desempenho	57
2.9.3	Métodos espectrofotométricos na região UV-Vis	62
2.9.4	Métodos fluorimétricos	64
2.9.5	Métodos eletroquímicos	65
2.10	Aplicação de PCs na determinação de vitaminas	66
2.10.1	Sistemas automáticos de análise.....	68
2.10.2	Sistemas automáticos de análise aplicados a vitaminas	71
2.10.3	Sistemas automáticos fluxo-batelada.....	73
3	EXPERIMENTAL	77
3.1	Reagentes e soluções	78
3.2	Bioprecusores.....	79
3.3	Amostras de suplementos vitamínicos e minerais.....	79
3.4	Amostras de cervejas e vinhos	81
3.5	Aparatos.....	82
3.6	Síntese, purificação, otimização e caracterização dos NSPCs	83
3.6.1	Cálculo do rendimento quântico de fluorescência.....	84
3.6.2	Caracterização elementar.....	85
3.6.3	Influência do tempo de irradiação com micro-ondas	85
3.7	Determinação fluorimétrica de RF utilizando NSPCs	86
3.7.1	Procedimento de análise pelo método convencional	87
3.7.2	Desenvolvimento do sistema fluxo-batelada.....	87
3.7.2.1	Montagem do sistema FBA	87
3.7.3	Procedimento automático de análise	89
3.7.3.1	Programa de controle	93
3.7.4	Métodos de referência para determinação de RF	95
3.7.4.1	Para comprimidos multivitamínicos	95

3.7.4.2	Para vinhos e cervejas	96
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.1	Síntese e caracterização dos pontos de carbono	98
4.1.1	Síntese e otimização dos pontos de carbono	98
4.1.2	Condições ótimas de síntese dos NSPCs	98
4.1.3	Rendimento quântico de fluorescência	99
4.1.4	Caracterização dos NSPCs	99
4.1.5	Influência da concentração e do pH	105
4.1.6	Influência do volume do tampão fosfato	106
4.1.7	Estudo de interferentes	107
4.2	Determinação de RF em suplementos multivitamínicos	108
4.2.1	Obtenção e validação da curva analítica	108
4.2.2	Análise das amostras de multivitamínicos e minerais	109
4.2.3	Teste de recuperação	111
4.3	Determinação de RF em cervejas e vinhos pelo método automático	112
4.3.1	Estudo da vazão nos canais	112
4.3.2	Obtenção e validação da curva analítica	112
4.3.3	Análise das amostras de vinhos e cervejas por adição de padrão	115
5	CONCLUSÃO	120
5.1	Perspectivas	122
6	REFERÊNCIAS	123
	ANEXO: Produção científica	146
	Artigo Publicado	147

RESUMO

Este trabalho apresenta uma abordagem rápida, simples, em etapa única e de baixo custo para preparação de pontos de carbono fluorescentes dopados com nitrogênio e enxofre (NSPCs), empregando o aquecimento em meio amoniacal, da biomassa proveniente da mistura de limão e cebola, através de forno de micro-ondas doméstico por apenas 6,0 minutos. Para a caracterização dos NSPCs, sua estrutura e propriedades ópticas foram investigadas através de técnicas espectroscópicas. Os mesmos, exibiram excelente estabilidade de fluorescência com alto rendimento quântico de fluorescência (23,6%), com partículas de dimensões 4,23–8,22 nm, com diâmetro médio de 6,15 nm, e solubilidade adequada para o método. Além disso, constatou-se que a fluorescência destes, na presença de riboflavina (RF) em tampão fosfato (pH 6,9), sofre uma atenuação proporcional e linear na faixa de concentração de 0,10 a 3,00 mg L⁻¹ dessa vitamina. A este fato, atribui-se o fenômeno de transferência de energia de fluorescência por ressonância (do inglês, *fluorescence resonance energy transfer* – FRET) entre os NSPCs (doador) e a RF(aceitador), cuja evidência está na sobreposição entre o espectro de emissão do NSPCs e o de absorção da RF. Diante do exposto, utilizou-se tal fenômeno como base para uma nova metodologia para determinação de RF em suplementos multivitamínicos e minerais e posteriormente em bebidas alcoólicas cervejas e vinhos, através de um sistema automático fluxo-batelada. Os limites de detecção e desvio padrão relativo para o método manual e automático foram estimados como sendo 1,0 ng mL⁻¹, < 2,6% e 4,0 ng mL⁻¹ e < 3,3%, respectivamente. O estudo de recuperação mostrou resultados entre 96,0% e 101%, para o método manual. Os métodos implementados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com os métodos de referência, ao se aplicar o teste *t* pareado a um nível de confiança de 95%. Desta forma, é demonstrada a viabilidade do novo método proposto, o qual além de simplicidade, apresenta robustez e características analíticas satisfatórias quando comparado com outros estudos na literatura, sugerindo que é uma alternativa potencialmente útil para a determinação da riboflavina em diferentes matrizes.

Palavras-chave: nanopartículas de carbono; fluorescência molecular; riboflavina; vinhos; cervejas; micro-ondas.

ABSTRACT

This work presents a fast, simple, one-step, and low-cost approach to the preparation of fluorescent nitrogen and sulfur co-doped carbon dots (NSCDs) through heating biomass from the lemon and onion mixture, through a domestic microwave oven for only 6.0 minutes. Aiming its characterization, the structure and optical properties of NSCDs were investigated by spectroscopic techniques. NSCDs displayed excellent fluorescence stability with a high quantum yield (23.6%) and the particle size was 4.23–8.22 nm with an average diameter of 6.15 nm. And good water solubility. In addition, a linear and proportional fluorescence attenuation was observed in presence of riboflavin (RF) in the range of 0.10 to 3.00 mg L⁻¹ of the vitamin in phosphate buffer (pH 6.9), which is attributed to an efficient fluorescent resonance energy transfer (FRET) between the NSCDs (donor) and RF (acceptor), whose evidence is overlap between the emission spectrum of NSCDs and the absorption spectrum of RF. This phenomenon was used as the basis for a new methodology for the determination of RF in multivitamin and mineral supplements and later in alcoholic beverages beer and wines, through an automatic flow-batch system. The limits of detection and relative standard deviation for vitamin and mineral supplements were estimated to be 1.0 ng mL⁻¹, < 2.6% and 4.0 ng mL⁻¹ e < 3.3%, respectively. Confidence level, and recovery study shows results between 96.0% and 101%. Which once applied and compared with reference method, no statistically significant differences were observed when applying the paired *t*-test at a 95 %. Thus, the viability of the new method is demonstrated, which besides simplicity presents a robustness and good analytical characteristics when compared with other studies in the literature, suggesting that it is a potentially useful alternative for the determination of riboflavin in different matrices.

Keywords: carbon nanoparticles; molecular fluorescence; riboflavin; beer; wines; microwave.

1

INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da problemática

Dentre os destaques da nanotecnologia, a exploração dos nanomateriais semicondutores conhecidos como *quantum dots* (QDs) e seu impacto em praticamente todos os campos da ciência, engenharia e saúde constituem um importante exemplo de inovação tecnológica no cotidiano (Poznyak et al., 2004), inclusive aplicações analíticas, nas quais os QDs podem ser utilizados como sensores luminescentes para o desenvolvimento de métodos químicos (Costas-Mora et al., 2014). No entanto, muitos compostos dessa classe, apresentam limitações de uso relativas à citotoxicidade inerente à sua composição, que pode conter elementos como Cd, Te e Se que podem bioacumular no organismo (Yong, Swihart, 2012; Hardman, 2006).

Diante do exposto, após a descoberta de uma nova classe promissora de materiais nanométricos denominados “pontos de carbono” (PCs), tais substâncias têm atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores, devido às semelhanças das propriedades ópticas dos PCs com as dos QDs, e ainda com vantagens como ausência da citotoxicidade dos metais pesados, baixo custo de produção, fácil obtenção, elevada solubilidade, biocompatibilidade, e abundância de materiais precursores. Aliado a isto, suas características peculiares possibilitam a pesquisa e o desenvolvimento de novos materiais em aplicações como bioimagens (Li et al., 2017), terapia contra o câncer (Hola et al., 2014), células solares (Essner, Baker, 2017), catalisadores (Pirasheb et al., 2018), LEDs (Yuan et al., 2018), sensores (Baptista et al., 2015), biossensores (Wang, Dai, 2015).

No setor produtivo, a química analítica é uma forte ferramenta para o controle da qualidade de fármacos, alimentos e bebidas, como exemplo (Kueppers, Haider, 2003; Nascentes, Kornb, Zanon, 2017). No entanto, algumas etapas envolvidas no processo analítico, podem torná-lo muito laborioso, dispendioso, impreciso ou inseguro ao meio ambiente (Knothe, 2013). Uma alternativa para se contornar algumas das desvantagens mencionadas, pode ser a utilização de PCs no desenvolvimento de nanossensores (Barati et al., 2015; Dolai, Bhunia, Jelinek, 2017).

As vitaminas são micronutrientes biologicamente ativos e essenciais para a manutenção da saúde humana e auxiliares na regulação das atividades metabólicas vitais (Burdock, 1997); as vitaminas hidrossolúveis consistem em nove grupos, os quais: B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₆ (piridoxina) e B₁₂ (cianocobalamina), B₃ (niacina), B₅ (ácido pantotênico), B₉ (ácido fólico), B₇ (biotina) e vitamina C (ácido ascórbico). Contudo, a sua estabilidade pode ser influenciada por fatores como temperatura, umidade, presença de oxigênio, radiação visível, pH do meio (Berger, Shenkin, Path, 2006). Em geral, a carência de vitaminas no organismo é denominada

avitaminose ou hipovitaminose, que pode afetar gravemente a síntese dos tecidos acarretando problemas de crescimento, interrupção na transmissão de impulsos nervosos, demência, afetar a visão, ser a causa de cicatrização demorada de feridas, resfriados recorrentes, anemia, fadiga, baixa fertilidade, acarretando suscetibilidade a diversas doenças. Para se evitar esse quadro, recomenda-se a ingestão diária de alimentos como frutas, verduras, carnes, ovos, leite e grãos, e se necessário, que se recorra à suplementação vitamínica (Combs, 2012).

A suplementação vitamínica combinada com outros nutrientes podem ser considerado um meio seguro, econômico e eficaz de normalização glicêmica, estando associada à redução da progressão do diabetes, entre outros benefícios (Kimball et al., 2017). A falta da riboflavina (RF), por exemplo, pode ocasionar problemas como fadiga, atraso no crescimento, problemas digestivos, além do desenvolvimento anormal de feto, dermatite seborreica, vermelhidão e inflamações, bem como a interferência no metabolismo de outras vitaminas do complexo B (Depeint et al., 2006; Lee, Corfe, Powers, 2013). Baseado nessa problemática, o mercado tem experimentado um importante crescimento de demanda, relativa a suplementos alimentares e bebidas fortificadas com vitaminas, pois além de suprir deficiências, tais produtos têm sido utilizados para manutenção da saúde e do metabolismo. Sabe-se, contudo, que os suplementos devem ser considerados uma solução de curto prazo, devendo ser consumidos sempre em doses recomendadas, e não como uma alternativa à alimentação saudável (Berger, Shenkin, Path, 2006; Ribeiro et al., 2011).

Além do alto consumo de suplementos polivitamínicos e minerais, o Brasil é um dos países com maior consumo de cerveja do mundo. A cerveja consiste em uma bebida geralmente alcoólica, empregada para fins recreativos e elaborada a partir de malte de cevada ou outros cereais, água, lúpulo e fermento à base de leveduras (Keukeleire 2000; Brasil, D.O.U., 2014). Em sua maioria, possui composição de 4,5 a 6,0 % de etanol ($v\ v^{-1}$) (Rosa, 2015), e também é rica em vitaminas B₁, B₂ e B₅ (Buiatti, 2009; Sleiman et al., 2010). Além disso, o consumo de cerveja pode estar relacionado a uma diminuição na atividade trombogênica, auxiliando pacientes com doença arterial coronariana (Gorinstein et al., 1997).

Assim como a cerveja, o vinho é uma das bebidas mais apreciadas pelo brasileiro e tem por composição majoritária o etanol e a água. Porém, sua complexidade se dá pela presença de açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, substâncias voláteis e aromáticas (Hashizume, 1983). O consumo moderado e não compulsivo de vinhos e cervejas, pode auxiliar a diminuir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Gaetano et. al., 2016).

Nesse contexto, os microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica em cervejas e vinhos produzem RF a uma taxa proporcional ao seu crescimento populacional (Tamer, Özilgen, Ungan, 1988). Todavia, a luz pode exercer um efeito danoso sobre os sabores dessas bebidas, conferindo a estes um gosto desagradável. Em certas concentrações, a RF seria o agente fotossensibilizador responsável pela degradação do sabor, devido à transferência de energia para compostos sulfurados, chegando a produzir substâncias de sabor pungente, comprometendo a qualidade do produto (Caballero, Blanco, Porras, 2012).

Diante do exposto e considerando a necessidade de garantia da qualidade dos produtos industrializados, manifesta-se a ânsia pela quantificação de vitaminas como a riboflavina, tanto em bebidas fermentadas quanto em suplementos vitamínicos. Aliado a isso, destaca-se a utilização dos PCs como reagente fluorescente suficiente para determinação de algumas dessas espécies de interesse (Wang et al., 2015a; Fong, Chin, Ng, 2016).

Os métodos convencionais utilizados para a determinação da RF em medicamentos, alimentos e suplementos, tais como o eletroquímico (Brezo et al., 2015) espectrofotométrico (Wang et al., 2015a; Kundu et al., 2016), imunoensaio (Wang et al., 2013), eletroforese capilar (Hu et al., 2007) e cromatografia líquida de alto desempenho, podem apresentar alguma complexidade em termos de pré-tratamento, consequentemente demandar mais tempo e custos (Petteys, Frank, 2011; Kakitani et al., 2014). Em contraste, um método direto utilizando PCs como reagente fluorescente pode trazer vantagens como rapidez na resposta, simplicidade, menor custo, portabilidade, entre outros, apresentando-se como uma alternativa de extrema importância para o controle químico de qualidade (Sun, Lei, 2017).

Há ainda a possibilidade de se agregar mais vantagens analíticas se tal método for aplicado em sistemas automáticos de análise química como o sistema fluxo-batelada, reduzindo a produção de resíduos, alcançando menores limites de detecção em geral, alta taxa de amostragem e a ausência de necessidade de utilização do fluido carregador, entre outras (Diniz et al., 2012).

Neste trabalho, buscou-se o aproveitamento das características dos PCs, entre as quais, síntese rápida em etapa única, custo reduzido e emprego de bioprecusores de fácil acesso, emissão ajustável de fluorescência, para o desenvolvimento de um novo método altamente sensível, baseado na transferência de energia de fluorescência por ressonância (FRET, do inglês, *fluorescence resonance energy transfer*), (Wang et al., 2015a), para determinação de riboflavina em suplementos vitamínicos, com posterior automatização por sistema fluxo-batelada empregando um LED ultravioleta como fonte de excitação e um espectrofluorímetro portátil (USB 4000, Ocean Optics®) como detector para análise de vinhos e cervejas. FRET é

um tipo de transferência não radiativa de energia, pela qual uma molécula doadora D energeticamente excitada, transfere energia via interações coulômbicas de baixa intensidade, para uma molécula receptora A, causando uma diminuição na fluorescência da molécula D, bem como um aumento na fluorescência de A (Förster, 1993). Além da riboflavina que emite na faixa de 500 a 650 nm quando excitada de 250 a 550 nm, a piridoxina também apresenta fluorescência natural na faixa de 330 a 440 nm quando excitada entre 240 e 370 nm (Hui et al., 2016).

1.2 Objetivos e metas

1.2.1 Objetivos

Desenvolver e propor novos métodos fluorimétricos empregando pontos de carbono na determinação de riboflavina em suplementos multivitamínicos e bebidas, utilizando um sistema fluxo-batelada.

1.2.2 Metas

- ✓ Síntese dos pontos de carbono em forno de micro-ondas, tendo como bioprecusores a melhor proporção de mistura dos sucos de limão e cebola em meio amoniacal;
- ✓ Caracterização das nanopartículas obtidas quanto às propriedades espectroscópicas, químicas e estruturais;
- ✓ Montagem e utilização de um sistema automático fluxo-batelada, empregando uma câmara de mistura com volume reduzido e janelas de quartzo, aplicando-o na determinação direta de RF em vinhos e cervejas;
- ✓ Desenvolvimento e validação de um método fluorimétrico para determinação de RF em suplementos multivitamínicos empregando os PCs sintetizados;
- ✓ Desenvolvimento e validação de um método fluorimétrico automático com adição de padrão para determinação de RF em cervejas e vinhos empregando os PCs sintetizados;
- ✓ Controle do sistema automático de dispensação, mistura e descarte de fluidos, e aquisição dos espectros de fluorescência, por meio de uma interface gráfica desenvolvida em ambiente LabVIEW®.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Nanomateriais e nanotecnologia

No meio ambiente, naturalmente são produzidas quantidades consideráveis de nanopartículas a todo instante como resultado de incontáveis processos físicos, como a erosão e a combustão de materiais (Buzec, Pacheco, Robbie, 2007), esses nanomateriais possuem dimensões extremamente reduzidas, porém com expressivas áreas superficiais, o que lhes pode conferir, propriedades físicas e químicas bem distintas, como uma maior reatividade por exemplo (Paschoalino et al., 2010; Batista, Larson, Kotov, 2015).

A ocorrência de nanopartículas pode se dar por via natural, antropogênica ou sintética. Sendo esta última geralmente direcionada a finalidades científicas (Hardman, 2006). Sabe-se que a inserção da nanotecnologia no cotidiano se deu há mais de mil e seiscentos anos, inicialmente através de técnicas de produção rudimentares, até o domínio de técnicas refinadas de fabricação de certos artefatos utilitários e artísticos como o cálice de Licurgo (Freestone et al., 2007), cerâmicas medievais do mediterrâneo (Reillon, Berthier, Andraud, 2010) os vitrais da Sainte-Chapelle em Paris (Schaming, Remita, 2015) e algumas decorações cerâmicas, produzidas desde os primeiros registros históricos e preservadas até os dias atuais (Leonhardt, 2007).

A nanotecnologia estende o domínio da ciência dos materiais, levando-a à sua forma mais precisa de manipulação, visando o estudo e aplicação das propriedades únicas que lhes são inerentes. Oferecendo assim, um horizonte de grandes avanços para segmentos científicos e tecnológicos em diversas áreas do conhecimento, como farmacêutica, biotecnologia, nutrição, cosméticos, agronegócio, instrumentação e sensoriamento químico, medicina, eletrônica, ciência da computação, física, e engenharia dos materiais, eis que a mesma pode ser aplicada no desenvolvimento e melhoria de materiais como semicondutores, nanocompósitos, biomateriais, chips, entre outros. Diante dessa perspectiva, estima-se que só para a próxima década, projeta-se uma tendência de aumento da ordem de cem vezes na produção de materiais que envolvem partículas em nanoescala (Paschoalino et al., 2010).

A consolidação da nanotecnologia e suas aplicações, parece servir como impulso para a busca de outros novos materiais cada vez mais complexos e específicos, despertando crescente interesse em praticamente todos os segmentos científicos (Miller, Serrato, Kundahl, 2005; Kaur, Singh, Kumar, 2012), o que é corroborado pelo aumento médio anual de 13,6% no número de publicações científicas na área de nanotecnologia, no período de 2000 a 2018 (StatNano, 2018). Esses fatos, conduzem à constatação de que uma importante parcela do

interesse da comunidade científica mundial encontra-se voltada para este campo (Huang, Crews, 2008; Roco, Mirkin, Hersam, 2011).

Nesta perspectiva, os nanomateriais denominados nanocristais semicondutores, têm recebido grande atenção na busca por aplicações diversas, inclusive na Química Analítica (Baruah e Dutta 2009; Rashidi, Khosravi-Darani 2011; Luo et al., 2013, Qu, Alvarez, Li, 2013; Costas-Mora et al., 2014; Kornienko et al., 2016). Ainda nesse contexto, o desenvolvimento da nanotecnologia pode viabilizar o desenvolvimento de sensores e dispositivos de diagnóstico com sensibilidade e seletividade suficientes para monitorar processos produtivos industriais diversos, favorecendo a busca da melhoria da qualidade ao longo das linhas de fabricação, e a partir daí se apresentem novas possibilidades em termos de controle de processos em geral (Neethirajan, Jayas, 2011).

2.2 Pontos de carbono (PCs)

O elemento carbono, quando observado em escala macroscópica, apresenta-se de maneira geral, como um material comum, negro e insolúvel, porém, em escala nano, pode-se constatar propriedades consideravelmente diferentes em sua estrutura (Li et al., 2012). O carbono é encontrado em um vasto número de estruturas distintas e sob formas alotrópicas estáveis, tais qual o diamante, o grafite, e em estruturas mais recentemente conhecidas, descritas como novos nanomateriais carbonáceos, entre os quais, os fulerenos (Kroto et al., 1985), nanodiamantes (Danilenko, 2004), nanotubos (Iijima, 1981), nanocintas de carbono (Povie et al., 2017) e grafeno (Zarbin, Oliveira, 2013). Tais materiais apresentam dimensões nanométricas com propriedades estruturais e eletrônicas bastante peculiares (Novoselov et al., 2004), dessa forma, têm conquistado espaço importante na nanociência (Baptista et al., 2015), figurando como os nanomateriais sintéticos dos mais amplamente pesquisados, discutidos e aplicados (Himaja, Karthik, Singh, 2015).

Ainda neste contexto, destaca-se outra classe de nanomateriais, os pontos de carbono (PCs), os quais, obtidos inicialmente de modo eventual, observados quando da purificação eletroforética de nanotubos de carbono de parede única. Os mesmos, foram inicialmente identificados como "nanopartículas de carbono", e posteriormente como PCs, evocando semelhanças com os pontos quânticos inorgânicos semicondutores, e também com os estruturalmente relacionados pontos quânticos de grafeno (Wang, Hu, 2014; Lim, Shen, Gao, 2015).

Os PCs são uma mistura de nanopartículas gráficas fluorescentes, aproximadamente esféricas, de estrutura geralmente desordenada, cuja síntese é relativamente fácil, a partir de diversos métodos já estabelecidos pela literatura (Baker e Baker, 2010). Possui composição majoritariamente de átomos de carbono sp^2 em sua estrutura, confinados em um núcleo que pode estar funcionalizado com vários grupos polares, ricos em oxigênio, nitrogênio, ou enxofre, a depender dos precursores e das condições de síntese, porém com possibilidade de apresentar uma composição química bastante variada (Li et al., 2012; Baker e Baker, 2010).

Os PCs possuem dimensões próximas de 10 nm e podem ser constituídos por centenas ou até milhares de átomos (Baker e Baker, 2010), são biocompatíveis, de produção relativamente simples e rápida, em comparação com a dos pontos quânticos semicondutores (QDs), além de apresentarem um alto rendimento quântico de fluorescência (RQF) e baixo custo de produção, devido à abundância do carbono (Li et al., 2012; Duan et al., 2016; Baptista et al., 2015).

Em etapas pós-síntese, os PCs podem sofrer modificações em sua superfície, resultando na inclusão de grupos funcionais, com o intuito de, por exemplo, aumentar o RQF ou o coeficiente de solubilidade em água. E de maneira mais específica, conferir-lhe seletividade a certa espécie de interesse (Wang, Hu, 2014; Wang et al., 2015c; Mondal et al., 2016; Chen et al., 2016). Geralmente, os PCs emitem fluorescência em uma faixa espectral considerada estreita, do azul ao laranja (Lan et al., 2015; Fan et al., 2014; Wang et al. 2011b), com poucos exemplos de nanopartículas emitindo na região do vermelho. Tal fenômeno está relacionado diretamente com o aumento do grau de oxidação na superfície dos PCs, e com a inclusão de heteroátomos dopantes como o N, presentes em estruturas que gerem longos pares conjugados de domínio aromático sp^2 , o que conduz a formação de mais centros de captura de elétrons, levando a mudanças significativas nos estados superficiais dessas nanopartículas, que podem levar a emissões com intensidade máxima a 710 nm (Ge et al., 2015; Jiang et al., 2015; Guo et al., 2016; Lu et al., 2017).

A representação esquemática da formação de alguns PCs pelos métodos sintéticos, seus precursores carbonáceos, e algumas moléculas e estruturas orgânicas, estão mostrados na Figura 1, na qual são ilustradas de maneira simplificada, as duas principais categorias de obtenção dessas nanopartículas, sendo a primeira, representada pelos métodos físicos ou *top-down*, que consistem na produção de PCs a partir da desagregação de estruturas carbonáceas de grandes dimensões e com alto teor de carbono. Tais métodos em geral, necessitam de condições de produção complexas e materiais dispendiosos, obtendo partículas com tamanhos heterogêneos (Baker e Baker, 2010), alguns métodos físicos se encontram exemplificados no lado inferior esquerdo da Figura 1, pela ablação a laser, oxidação eletroquímica e arco elétrico.

O segundo modo de obtenção de PCs, consiste nos métodos químicos denominados *bottom-up*, os métodos se caracterizam pela agregação de moléculas e estruturas orgânicas, de maneira geral, apresentam resultados promissores com tamanho das partículas mais homogêneo e reprodutível, sendo considerados métodos mais simples e menos dispendiosos. Em consequência disto, o interesse científico em torno dos mesmos parece evoluir positivamente. Na Figura 1, os métodos *bottom-up* estão exemplificados por técnicas como, o aquecimento por micro-ondas, o tratamento hidrotérmico, e o ultrassom.

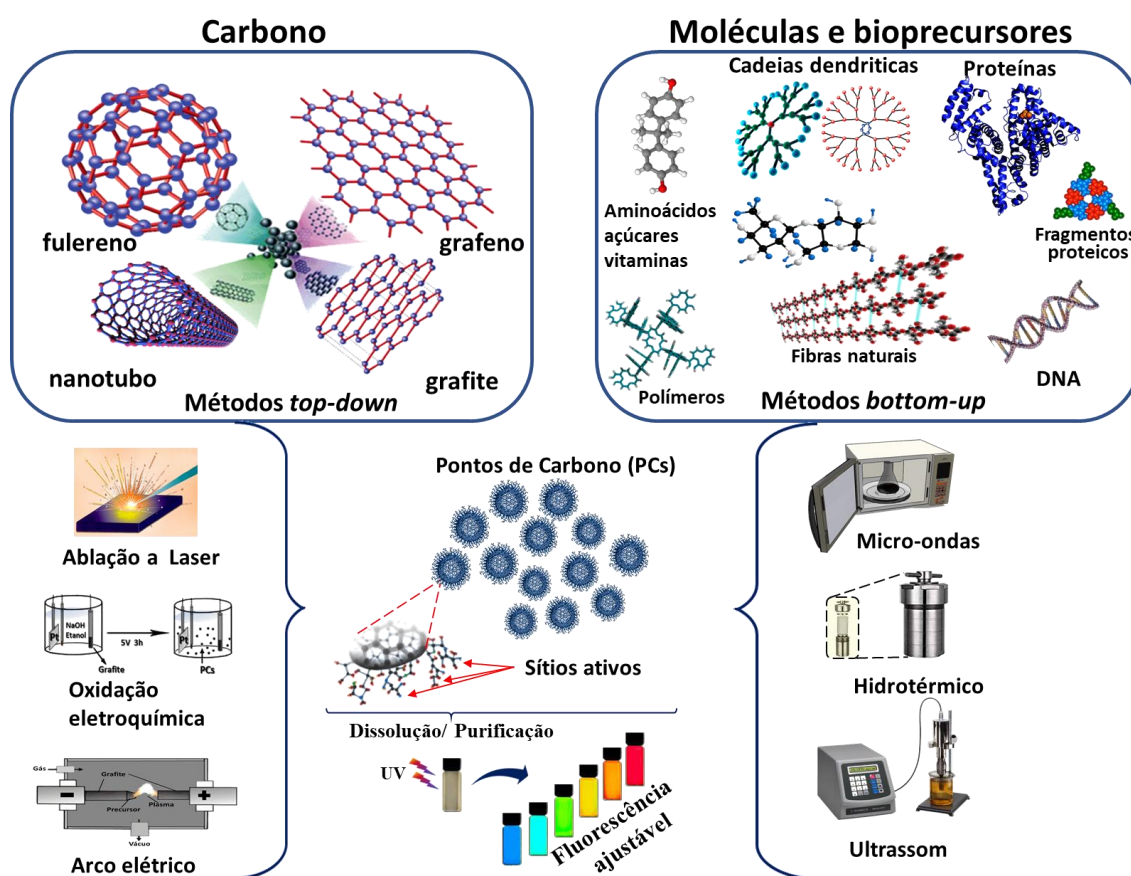


Figura 1 - Representação de abordagens para obtenção de PC, a partir de precursores carbonáceos e algumas técnicas utilizadas para os métodos agregadores (bottom-up) e desagregadores (top-down).

Os procedimentos de síntese são complementados por purificação, através de etapas como filtração, centrifugação, diálise e eletroforese (Baker e Baker, 2010). Os PCs estão representados no centro da Figura 1, destacando-se os seus sítios ativos, os quais podem ser radicais carbogênicos, carboxila, hidroxila, carbonila, entre outros (Lim, Shen, Gao, 2015; Machado et al., 2015). Muitos radicais presentes na superfície dos PCs são considerados armadilhas emissivas. Tais estruturas seriam responsáveis pela propriedade de emissão

ajustável de fluorescência (representada na parte inferior central da Figura 1), típica deste nanomaterial, ou seja, PCs possuem fluorescência dependente da excitação ultravioleta (UV) recebida em comprimentos de onda distintos (Li et al., 2014a; Lim, Shen, Gao, 2014, Baker e Baker, 2010). Características como alto RQF, fluorescência ajustável, e facilidade de funcionalização, apresentadas pelos PCs, aumentam as possibilidades de aplicação dessas nanopartículas (Li et al., 2012). Nessa perspectiva, os estudos em busca de rotas de síntese mais simples e menos dispendiosas para produção de PCs, com altos RQF, bem como do desenvolvimento de novas aplicações envolvendo essas nanopartículas, têm aumentado expressivamente (Barati et al., 2015; Baker e Baker, 2010; Himaja, Karthik, Singh, 2015). No entanto, particularidades como a origem da fluorescência e os mecanismos de formação estrutural dos PCs, ainda apresentam grande complexidade, de modo que sua elucidação ainda é objeto de pesquisas (Liu et al., 2019). Na etapa de síntese, o foco, portanto, se dá em termos de manipulação empírica do ambiente reacional, de modo que se controle a condensação dos grupos funcionais superficiais requeridos, para se obter nanopartículas com propriedades fluorescentes específicas, e alta intensidade de sinal (Hu et al., 2017; Baker e Baker, 2010; Hu, Trinchi, Atkin, 2015).

O crescimento em torno da pesquisa e desenvolvimento científico relacionados com os PCs, pode ser corroborado pela grande quantidade de processos de síntese, já estabelecidos na literatura especializada, destacando-se aqueles que se utilizam de bioprecusores com grande disponibilidade, como folhas, grãos, sementes, frutas, bebidas (Hsu et al., 2012; Sun, Lei, 2017; Hu et al., 2010; Baptista et al., 2015).

Resíduos provenientes de diversas fontes como alimentos e bebidas, entre outros, são materiais de fácil aquisição e relativa abundância, e de baixo impacto ambiental, quando utilizados como precursores na produção de PCs (Tripathi et al., 2014; Sarswat, Free, 2015).

Uma das vantagens de se utilizar bioprecusores para a síntese de PCs é o fato de serem uma alternativa aos métodos tradicionais, que utilizam substâncias sintéticas ou de complexa elaboração (Liang et al., 2013; Sahu et al., 2012). Outra vantagem é que, a síntese em etapa única envolvendo precursores naturais, geralmente resulta em PCs passivados ou funcionalizados (Sun et al., 2013), já que a presença de diversos tipos de substâncias no próprio precursor, promovem essas modificações superficiais (Sharma et al., 2017).

Nessa perspectiva, constata-se a crescente procura por substâncias naturais, adequadas para a produção dessas nanopartículas, bem como a otimização e simplificação dessas condições de síntese, de modo que estas se apresentem como alternativas mais viáveis em substituição aos precursores sintéticos. A seguir, estão listados alguns exemplos de PCs

utilizando precursores naturais como, laranja (Sahu et al., 2012), banana (De e Karak, 2013), morango (Huang et al., 2013), caldo de cana (Mehta, Ja, Kailasa, 2014), ovo de galinha (Wang, Wang, Chen, 2012), aveia (Yu et al., 2015), leite (Wang, Zhou 2014), limão (Basavaiah et al., 2018; Tyagi et al., 2016; Ding et al., 2017; Mondal et al., 2016; Hoan et al., 2018), alho (Sun et al., 2016; Zhao et al., 2015), cebola (Bankoti et al., 2017; Bandi et al., 2016), e até materiais que podem em alguns casos, ser classificadas como resíduos tais como, sabugo de milho (Shi et al., 2017), caule de bananeira (Vandarkuzhali et al., 2017), entre outros.

O limão (*Citrus limonum*) pode ser utilizado na produção de PCs como precursor do carbono por ser uma fonte rica em ácidos cítrico (6% m m⁻¹) e L-ascórbico (64% m/m), (Penniston et al., 2008; Mendonça et al., 2006). A cebola (*Allium cepa*), é uma importante fonte de compostos sulfurados (Liguori et al., 2017, Bandi et al., 2016; Hovius, Goldman, Parkin, 2005; Almeida e Suyenaga, 2009), e o hidróxido de amônio 25% (v v⁻¹) pode ser usado como um agente dopante para nitrogênio (Edison et al., 2016). Ambos os ácidos já foram utilizados como precursores na preparação de pontos de carbono (Mondal et al., 2016; Sajid et al., 2016).

Do exposto, pelo fato dos bioprecursores limão e cebola, apresentarem similaridade em sua constituição química, com as substâncias sintéticas utilizadas na produção de PCs funcionalizados com N e S, utilizados como sensores para a RF descritos na literatura (Wang et al., 2017; Wang et al., 2015a; Kundu et al., 2013; Kundu et al., 2015; Mondal et al., 2016), decidiu-se estudar a síntese de PCs, buscando a proporção adequada entre os três componentes citados, de modo a se obter nanopartículas funcionalizadas com S e N (NSPCs) com alta luminescência e que interajam seletivamente com a RF, porém visando obtenção menos dispendiosa e maior rapidez.

A seguir, alguns dos principais métodos químicos utilizados na síntese de PCs serão abordados.

2.3 Síntese de PCs via irradiação por micro-ondas

A aplicação de micro-ondas em química analítica ocorre desde a década de 1970, focada principalmente em processos de digestão de amostras para análise elementar, extração de diversas substâncias, dessorção térmica de vários compostos (Lamble, Jill, 1998) e redução significativa dos ciclos de secagem, de horas para minutos (Fanslow, 1990; Beary, 1998; Thompson, Ghadiali, 1993). Tal sistema se utiliza de dois fenômenos para produzir calor, quais sejam, o alinhamento seguido de desalinhamento das moléculas afetadas pelo campo elétrico, que ocorre em um ciclo de aproximadamente 5×10^9 vezes por segundo, fazendo com que uma

apreciável quantidade de energia seja liberada, e dissipada na forma de calor, juntamente com a fricção causada pelo movimento destas moléculas sob efeito do campo eletromagnético. Estes dois fatores resultam em quantidade apreciável de calor transferido ao sistema, podendo levar a água próximo ao superaquecimento (Barbosa et al., 2001). Os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas por irradiação com micro-ondas doméstico datam de 1986, de duas pesquisas independentes (Gedye et al., 1986; Guigere et al., 1986).

A utilização de micro-ondas em reações orgânicas é vantajosa, por envolver baixo custo, rápida geração de calor, e ausência de toxicidade por parte do solvente (An et al., 1997). Porém, são as características anômalas apresentadas pela água, como por exemplo o aumento expressivo do seu produto iônico com o aumento de temperatura, que a tornam um atrativo, a ser utilizada juntamente com o micro-ondas, eis que tal propriedade, afasta a necessidade de emprego de ácidos ou bases no processo em questão, pois as concentrações, tanto de íons hidróxido quanto de íons hidrônio da água passam a ser muito maiores nestas condições (Sanseverino, 2002).

A quantidade de calor produzido pelo forno de micro-ondas ao se irradiar em uma dada substância, depende de alguns fatores como, o tamanho e a polaridade das moléculas, a frequência e a potência de micro-ondas utilizados. Curiosamente, há outros fatores que também interferem no calor produzido, e que podem ser interdependentes, como a viscosidade, e a própria capacidade de dissipação de energia do sistema (Barboza et al., 2001), nesse sentido, o estudo envolvendo micro-ondas caseiro na produção de PCs se limita a variar o menor número de parâmetros possível, como a concentração dos precursores, e o tempo de irradiação (Liu et al, 2014; Jaiswal, Ghosh, Chattopadhyay, 2012; Zhai et al., 2012).

Dentre os métodos de síntese de PCs, o método de irradiação por micro-ondas é um dos mais favoráveis devido ao seu curto tempo de reação, baixo consumo de energia, simplicidade, facilidade de operação, aquecimento simultaneamente rápido e homogêneo, fato que beneficia a formação de PCs com dimensões mais uniformes (Jaiswal, Ghosh, Chattopadhyay, 2012).

Um resumo das etapas envolvidas na síntese de PCs por micro-ondas está representado na Figura 2. Em geral, as etapas de formação dos PCs através desse método são semelhantes às demais. Após a irradiação, e conseqüentemente o aquecimento da mistura de precursores (Figura 2A), os aglomerados moleculares reticulados começam a ser gerados através da desidratação intramolecular (Figura 2B) e intermolecular, seguida de polimerização, podendo então ocorrer a introdução de grupos oxigenados na superfície dos PCs, favorecendo assim o aparecimento de defeitos na superfície (Figura 2C) do nanomaterial produzido e servindo como pontos de ancoragem para grupos funcionais de passivação (Zhang et al., 2010). Tais

aglomerados reticulados, a depender dos produtos de partida, podem já apresentar uma forte fluorescência (Figura 2C), assemelhando-se aos corantes orgânicos fluorescentes (Kubitscheck, 2013). Com a continuidade do tempo de irradiação, podem ocorrer tanto a hidrólise alcalina quanto a ácida (Sanseverino, 2002), de extremidades da cadeia, inclusive de parte dos grupos fluorescentes presentes nos aglomerados moleculares, juntamente com a carbonização de parte dos grupos orgânicos, dando início ao núcleo carbônico grafítico passivado (Figura 2D) com grande número de grupos funcionais contendo oxigênio ou outros átomos, a depender dos precursores.

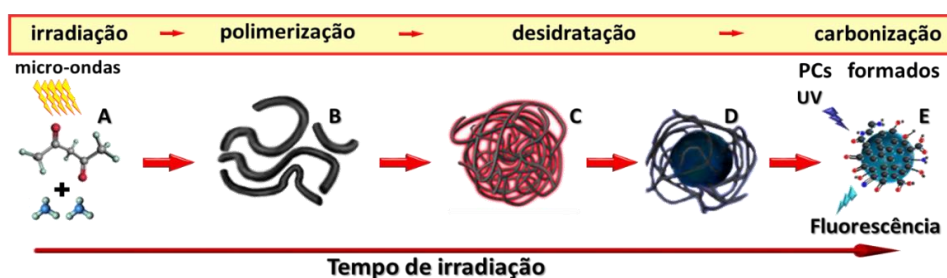


Figura 2 - Etapas de síntese de PC a partir de irradiação com micro-ondas. Adaptada de He et al., (2017).

Grande parte da fluorescência observada nos PCs pode ser atribuída aos grupos responsáveis pela passivação superficial, e pela funcionalização, que corresponde a sítios emissores com certa reatividade química ou biológica, introduzidos de maneira controlada. Apenas uma pequena parte da fluorescência é atribuída à sinergia entre o núcleo de carbono e os grupos contendo oxigênio ou outros elementos na superfície dos PCs. Na medida que o tempo de aquecimento (irradiação) se prolonga, mais e mais fluoróforos podem ser carbonizados, aumentando o tamanho do núcleo grafítico e diminuindo a fluorescência do nanomaterial. Diante disso, com a otimização do tempo de exposição ao micro-ondas, pode-se alcançar a fluorescência e as propriedades adequadas para o material sintetizado (Figura 2E). Em resumo, o processo de formação dos PCs pode ser descrito por etapas mais gerais como, desidratação intramolecular e intermolecular, polimerização, nucleação e carbonização, que se estabelece com os grupos superficiais posicionados no núcleo poliaromático. (He et al., 2017; Shamsipur et al., 2018a).

2.4 Passivação e Funcionalização superficial de PCs

Alguns PCs produzidos principalmente por métodos *top-down* podem apresentar baixa fluorescência. Nestes casos, pode haver a necessidade de se realizar uma modificação adicional na superfície dos PCs, como a passivação, por exemplo, e dentre as alternativas de passivação,

há a oxidação com ácido nítrico, de modo a promover a formação de grupos oxigenados na superfície, ou a fixação de cadeias orgânicas à mesma (Li et al., 2012; Li e Dong, 2018). A passivação da superfície dos PCs tem por finalidade, tanto o aumento da intensidade de fluorescência, quanto o aumento da estabilidade fotoquímica em solução (Ray et al., 2009; Sun et al., 2006). PCs dopados com heteroátomos, especialmente N e S, podem apresentar propriedades ópticas ajustadas para utilização em determinações analíticas específicas (Duan et al., 2016; Wang et al., 2015d; Mondal et al., 2016; Shen et al., 2017; Li e Dong, 2018).

Geralmente nos métodos *bottom-up*, ocorrem simultaneamente passivação e funcionalização dos PCs (Baker e Baker, 2010; Dimos, 2016) como é descrito no exemplo: produção de PCs a partir de ácido cítrico e cisteína, com RQ de 42,7% (Wang et al., 2015a). No entanto, caso haja a necessidade, além da passivação, os PCs podem adicionalmente, sofrer modificações como a funcionalização de sua superfície, de modo que a mesma se adeque à finalidade a qual foi destinada. Há diversas alternativas para incremento dessas modificações, que podem se dar a partir da introdução de cadeias na superfície dos PCs, constituídas a partir de polímeros, pequenas moléculas ou mesmo proteínas, a depender do tipo de síntese e da finalidade da modificação. Os procedimentos adicionais de introdução dessas cadeias modificadoras nos PCs, geralmente são diretos e de baixa complexidade (Silva, Gonçalves, 2011; Sun et al., 2006; LeCroy et al., 2014; Wang, Hu, 2014; Lim, Shen, Gao, 2014; Zhu et al., 2015; Baker e Baker 2010), alguns são descritos nos exemplos: utilização do polietilenoglicol com o ácido mercaptosuccínico como agente funcionalizante (Gonçalves, Silva, 2010) da etilenodiamina como fonte de carbono, e ácido sulfâmico como agente de passivação superficial para preparar pontos de carbono dopados com nitrogênio e enxofre (NSPCs) com RQF de 28% (Duan et al., 2016); O emprego do ácido cítrico e da cisteína na preparação de PCs com RQF de 42,7% (Wang et al, 2015a); utilização de um único bioprecursor como o alho, para a obtenção de NSPCs, com RQF de 13%, sugerindo que a utilização de bioprecursores, pode representar uma importante alternativa na utilização de fontes de carbono e agentes de modificação superficial com heteroátomos (Chen et al., 2016).

Diversos polímeros ou moléculas orgânicas podem ser utilizados como agentes modificadores (Sun et al., 2006). Como é o caso de derivados de polietileno glicol (PEG), ou outras moléculas poliméricas com grupos funcionais do tipo éster, imida, imina ou amina (Sun et al., 2006; Mao et al., 2010; Li et al., 2010a; Yang et al., 2009; Wang et al., 2010; Kwon et al., 2013; Wu et al., 2013; Liu et al., 2012). Além da funcionalização, tal tratamento pode promover a introdução de aminas superficiais na própria estrutura do ponto quântico, as quais podem ser caracterizadas como armadilhas emissivas ou defeitos na superfície dos PCs, de

modo que as duas modificações se complementam (Dimos, 2016). Como exemplificado no trabalho de Hu e colaboradores (2017), os quais alteraram os estados emissivos de PCs, através da funcionalização com inserção de diferentes amino-substituintes, resultando assim em três tipos de PCs, em que cada um apresentou sua intensidade máxima de fluorescência em comprimentos de onda diferentes.

2.5 Propriedades ópticas dos PCs

Os nanomateriais são detentores de propriedades peculiares, cuja exploração é uma das principais fontes de produção de novas tecnologias. As propriedades ópticas de fluorescência e absorbância dos PCs serão abordadas a seguir.

2.5.1 Fluorescência

A fluorescência consiste na emissão de radiação eletromagnética por um sistema, levado a um estado ativado por um processo de excitação e absorção de fótons, cujo tempo de luminescência seja inferior a 10^{-5} s.

A excitação eletrônica envolvida neste fenômeno ocorre geralmente na região do ultravioleta, e se dá a partir de uma fonte externa, cuja energia seja suficiente para excitar os elétrons a um estado de energia maior do que o *bandgap* do sistema. Tal excitação resulta em um estado metaestável, levando os elétrons envolvidos a uma relaxação ou decaimento seguido do retorno a uma configuração energética mais estável.

O complexo mecanismo envolvido na emissão de fluorescência (FL) dos PCs, que ocorre mesmo sem funcionalização adicional (Lim et al., 2014; Li, Dong, 2018) ainda é objeto de discussão, porém, a análise de aspectos como variações nos tipos de precursores, condições de síntese, etapas pós-síntese, ou a própria funcionalização da superfície dos PCs e seus desdobramentos no comportamento óptico apresentado pelos mesmos, podem ajudar a nortear possíveis origens do fenômeno (Wei, Qiu, 2014; Cayuella et al., 2016).

Na prática, a propriedade intrínseca aos PCs mais abordada e explorada é a sua fluorescência ajustável (dependente do comprimento de onda de excitação), (Wang, Hu, 2014; Guo et al., 2016; Lim, Shen, Gao, 2014; Wei, Qiu, 2014). Tal aspecto vem sendo aproveitado em importantes aplicações, como apresentadas na Tabela 1.

Considerando o estado fundamental dos PCs, representado pelo orbital ocupado, de mais alta energia (HOMO), o estado excitado, pelo orbital desocupado de menor energia (LUMO),

e o *bandgap*, como sendo a região compreendida entre estes estados, porém, normalmente inacessível aos elétrons (Baccaro e Gutz, 2018).

Tabela 1 - Algumas características básicas da fluorescência dos PCs exploradas em aplicações analíticas.

Precursor	Aplicação	Referência	Característica Explorada
Ácido ascórbico, Kollicoat®*	Determinação de tioguanina e mercaptopurina;	Garg et al., 2018.	Atuando em processos de FRET
Etilenodiamina, glicerol	Determinação de H ₂ S dissolvido	Yu et al., 2013.	
Babosa	Determinação de tartrazina	Xu et al., 2015a.	Supressão da fluorescência (<i>turn-off</i>)
Ácido <i>p</i> -aminosalicílico, etileno glicol dimetacrilato	Determinação de Fe(III)	Shamsipur et al., 2018.	Supressão da fluorescência (<i>turn-off</i>)
Ureia, polietilenoglicol	Determinação de biotióis	Borse et al., 2017.	Aumento da fluorescência (<i>turn-on</i>)
Ácido tânico	Determinação de tetraciclina	An et al., 2015.	
Membrana de casca de ovo;	Determinação de glutatona	Wang et al., 2012.	Recuperação da fluorescência de complexos metal-PCs
Hexadecilamina, isopropanol, tetraetóxisilano, Ácido cítrico, 1,2-etilenodiamina	L-Cisteína; Cu ²⁺	Zong et al., 2014.	
	Iodo	Du et al., 2013.	

* Aditivo para medicamentos.

No fenômeno da fluorescência, a relaxação com emissão de fótons envolve uma quantidade menor de energia daquela absorvida na excitação. Consequentemente, maiores comprimentos de onda de emissão, por conta de outros mecanismos de desativação, como por exemplo processos não radiativos de transição energética, ou armadilhas emissivas (Sharon, Sharon, 2015; Cayuella et al., 2016; Baker e Baker, 2010; Sun et al., 2006; Skoog et al., 2006; Harris, 2005).

Os pontos quânticos inorgânicos semicondutores, diferentemente dos PCs, não apresentam defeitos em sua superfície. Em consequência disto, sua fluorescência é essencialmente governada pelo fenômeno de confinamento quântico, o qual possui grande

dependência com o tamanho das nanopartículas, uma vez que as mesmas não possuem estados adicionais de energia (estados de armadilhas de superfície) relacionados ao *bandgap* (Cayuella et al., 2016).

Nesse sentido, Riggs e colaboradores (2000), iniciaram uma investigação acerca da origem da fluorescência dos PCs, chegando à conclusão que certos defeitos superficiais poderiam ser uma das possíveis fontes desse fenômeno.

Sun e colaboradores (2006), em uma das primeiras publicações referentes às nanopartículas descritas como "*carbon dots*", na qual destacaram o fato dos PCs produzidos, a princípio, não apresentarem fotoluminescência alguma, nem mesmo após a purificação e posterior tratamento com ácido forte. No entanto, após a funcionalização da superfície com o polietileno glicol, o material passou a apresentar uma forte fotoluminescência. Eles ainda observaram que PCs funcionalizados com outras substâncias, também apresentaram fotoluminescência semelhante àquela obtida através do polietilenoglicol como agente funcionalizante.

Considerando as propriedades apresentadas, juntamente com o fato de nanopartículas de carbono passivadas apresentarem elevada relação entre superfície e volume, bem como valores de RQF inversamente proporcionais ao seu tamanho. Devido a esta dependência das propriedades ópticas com os fenômenos superficiais apresentados pelas nanopartículas, alguns autores têm atribuído ao confinamento quântico, uma parcela de contribuição à fluorescência dos PCs (Li et al., 2010; Baker e Baker, 2010).

As nanopartículas produzidas a partir de materiais como o grafeno apresentam fluorescência decorrente de estados de armadilha de superfície, cujas energias se situam na região do *bandgap*, em decorrência de defeitos já discutidos anteriormente. Nestes casos, o elétron, quando excitado por um fóton, pode ser aprisionado por estas armadilhas, e após posterior recombinação, resultar em um processo emissivo com energia mais baixa em maiores comprimentos de onda (Sharon, Sharon, 2015).

Outra observação importante acerca do ajuste de fluorescência através de incorporação de grupos funcionais nos PCs foi feita por Hu e colaboradores (2017), os quais ajustaram os estados emissivos dos PCs por intermédio da incorporação de substituintes diferentes nas moléculas utilizadas como funcionalizante, resultando em PCs com diferentes bandas de emissão, as quais apresentaram sua maior intensidade de fluorescência em comprimentos de onda cada vez maiores, conforme a diminuição do *bandgap* do sistema.

Nesse sentido, evidencia-se a estreita relação que há entre as modificações superficiais, as quais se comportam como armadilhas emissivas ou centros fluoróforos, e a fluorescência dos

PCs (Silva, Gonçalves, 2011; Xu et al., 2013; Cayuella et al., 2016), sobretudo, devido ao aparecimento inicial dos defeitos de superfície ocorrer a partir da geração de aglomerados reticulados, na etapa de desidratação dos precursores, seguida da introdução dos grupos superficiais oxigenados, ou fluoróforos (Cayuella et al., 2016; Zhang et al., 2010).

Pelo fato das armadilhas emissivas e dos grupos funcionalizantes não serem idênticos entre si, a fotoluminescência proporcionada tanto pela passivação quanto pela funcionalização dos PCs, pode estar fortemente associada ao tipo e à distribuição dessas armadilhas ao longo da superfície dos mesmos (Li, Dong, 2018).

Dessa forma, o aumento da diversidade de grupos funcionais ou fluoróforos individuais distribuídos na superfície das nanopartículas, contribui para o alargamento das bandas de emissão de fluorescência (Bourlinos et al., 2008b; Cayuella et al., 2016).

Ainda segundo Cayuella e colaboradores (2016), nanomateriais fluorescentes provenientes de moléculas em geral obtidos a temperaturas mais baixas, por abordagens do tipo *bottom up*, com nucleação não cristalina, não apresentariam o fenômeno de confinamento quântico. Teriam como fator responsável pelo fenômeno de fotoluminescência e do alargamento de bandas, apenas a superposição energética proveniente de diversos centros emissores contidos na superfície da nanopartícula, quer sejam fluoróforos, ou grupos individuais. Cayuella e colaboradores (2016) acrescentam ainda que, PCs podem formar complexos não fluorescentes na presença de cátions de metais tóxicos.

2.5.2 Considerações sobre o mecanismo de fluorescência dos PCs

Diante do exposto, parece adequado sugerir que, a depender da complexidade dos precursores, principalmente daqueles advindos de biomassa, bioprecursores, e do tipo de abordagem utilizada em sua síntese, o nanomaterial produzido poderia apresentar fluorescência dependente de cada uma das características mencionadas, quais sejam: defeitos estruturais, estados emissivos, ou armadilhas de superfície, que podem ser incorporados, tanto nas regiões amorfas quanto nas regiões cristalinas presentes na estrutura do núcleo dos PCs, a partir da etapa inicial de sua formação (Qu et al., 2014; Li, Dong, 2018).

Os PCs produzidos a partir de bioprecursores apresentam semelhança em suas etapas de síntese, dessa forma, pode-se buscar o controle das etapas de oxidação, passivação e funcionalização, através da modulação das mesmas, para que se obtenham as nanoestruturas requeridas (He et al., 2017; De e Karak, 2013; Lee et al., 2017).

Nessa perspectiva, parece plausível que haja condições para que os estados mencionados, característicos dos PCs, contribuam positivamente na composição da fluorescência da nanopartícula como um todo. Desta forma, o valor do *bandgap* da mesma, teria uma relação direta com a quantidade desses defeitos incorporados. Assim, a sobreposição das influências das emissões individuais em conjunto com os fluoróforos e as armadilhas emissivas, poderiam ser os fatores responsáveis tanto pela fluorescência ajustável (dependente da excitação), quanto pelo alargamento das bandas de emissão (Li, Dong, 2018; Mondal et al., 2016; Ding et al., 2017; Cayuella et al., 2016).

A Figura 3 ilustra a oxidação seguida da formação de alguns defeitos de superfície, uma das possíveis etapas envolvidas na formação de PCs provenientes de bioprecursores. Os grupos superficiais formados, podem atuar tanto como armadilhas emissivas (Ding et al., 2016) como servir de ancoragem para uma camada de passivação superficial, a depender das condições de síntese (Li e Dong, 2018).

No decorrer do processo de síntese, uma fração segmentada da nanoestrutura gráfitica e cristalina (lado esquerdo da Figura 3), formada após condensação e polimerização dos bioprecursores, sofre oxidação em decorrência da continuidade da carbonização do material orgânico, em consequência disso, sua estrutura, que a princípio mostrava regularidade na alternância entre ligações simples e duplas, passa a perder tais alternâncias, dando lugar a uma estrutura desorganizada face à entrada de grupos carbogênicos. Assim, uma nova composição estrutural se forma, contendo áreas onde portadores de carga estariam inclusos.

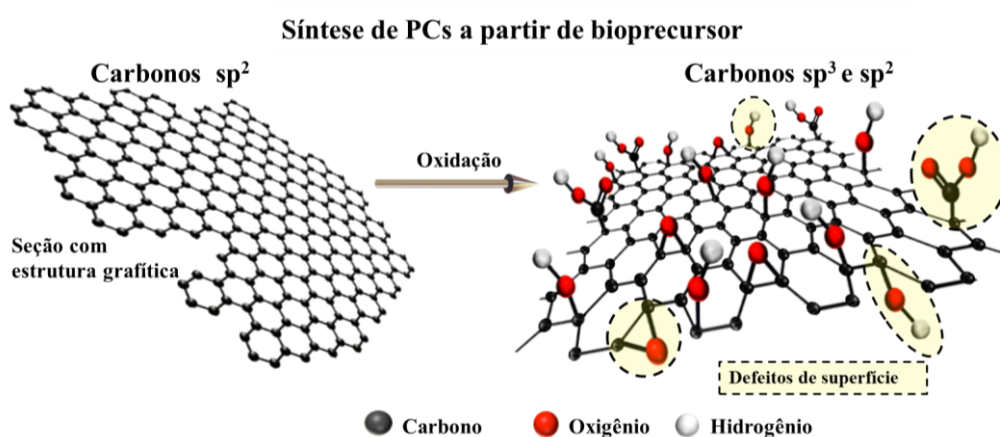


Figura 3 - Ilustração de uma das possíveis etapas da síntese de PC a partir de um bioprecursor. Adaptada de Singh, Kumar, Singh (2016).

Nessa perspectiva, parece coerente admitir que a fluorescência dos PCs seja resultado da contribuição dos diversos tipos de mecanismos, como é mostrado na Figura 4, que ilustra os possíveis mecanismos envolvidos na fluorescência dos PCs.

Considerando que as propriedades superiores de fluorescência dos PCs podem ser eficientemente reduzidas por um agente receptor ou doador de elétron, eis que tais espécies facilitariam recombinações não-radiativas de elétrons em portadores de carga (Figura 4A), presentes na superfície dos PCs, através de um processo eficaz de transferência de elétrons (Shi et al., 2014). A Figura 4A, ilustra o fenômeno da armadilha emissiva, formada após a funcionalização através dos sítios ativos, gerando defeitos de superfície, consequentemente resultando em um sistema portador de carga. Após absorver energia suficiente para ser promovido ao orbital LUMO, e retornar ao estado fundamental, o elétron é aprisionado na armadilha constituída pelo portador de carga (Figura 4A e A1), deste modo, a recombinação conduz a uma emissão radiativa de menor energia (maiores comprimentos de onda).

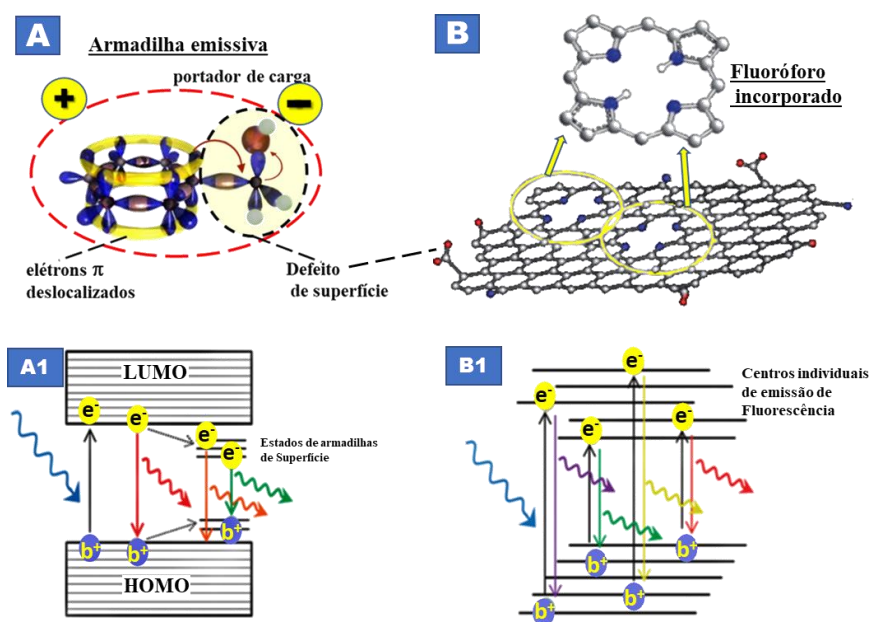


Figura 4 - Mecanismo envolvido na composição da FL dos PC Armadilha emissiva (A, A1), confinamento quântico (A1), Fluoróforos incorporados (B), centros de emissão individuais (B1), (Ilustração adaptada de Cayuela et al., 2016; Mondal et al., 2016).

A figura 4 destaca além dos defeitos de superfície, outros sistemas que podem ser responsáveis pela fluorescência dos PCs, que são, o confinamento quântico (canto esquerdo da Figura 4A1), e os fluoróforos incorporados (Figura 4B), estes últimos, parecem contribuir de maneira significativa para o aumento da intensidade de fluorescência do nanomaterial.

Considerando um caso particular, no qual o mecanismo fluoróforo seja o único responsável pela fluorescência do nanomaterial, a fluorescência se daria a partir de centros

fluorescentes individuais distribuídos ao longo da superfície da nanopartícula (Figura 4B1), este tipo de mecanismo também acarretaria no aparecimento de bandas de emissão mais alargadas, em consequência da presença de vários sinais de emissão sobrepostos, provenientes destes centros emissivos individuais (Eda et al., 2010; Krishnamoorthy et al., 2012; Baker e Baker, 2010; Li et al., 2012; Cayuella et al., 2016).

Muitos produtos naturais como limão, laranja, goiaba e abacaxi, apresentam quantidades apreciáveis de ácidos cítrico e ascórbico. O ácido cítrico tende a se condensar em regiões poliaromáticas, e o ácido ascórbico, na presença suficiente de nitrogênio, pode se condensar diretamente no núcleo do nanomaterial, constituindo numa estrutura emissiva independente, similar ao núcleo porfirínico, um poderoso fluoróforo, como é visto na Figura 4B, (Qu et al., 2014; Li et al., 2010; Mondal et al., 2016; Ding et al., 2017; Cayuella et al., 2016; Shamsipur et al., 2018a).

PCs funcionalizados com elementos de maior eletronegatividade que o carbono como o N, apresentam emissão máxima deslocada para menores comprimentos de onda, enquanto que a funcionalização com elementos de menor eletronegatividade que o carbono como o S, causam deslocamento de emissão máxima para maiores comprimentos de onda (Yang et al., 2014). No entanto, a inserção de funcionalizações oxigenadas introduz mais estados eletrônicos (centros emissores) entre o *bandgap* do sistema levando a um deslocamento de emissão máxima para maiores comprimentos de onda e reduzindo o RQF da partícula. Dados experimentais têm mostrado que nanopartículas que emitem do azul ao vermelho apresentam gradualmente mais radicais epóxi e hidroxilas e menos carbonila e C-N (Dimos, 2016). Quanto maior o tamanho da nanopartícula, menor será o *bandgap*, deslocando a sua emissão máxima para valores de maior comprimento de onda (Li et al., 2010).

Do exposto, considerando a estrutura sólida, desordenada e complexa que os PCs possuem, se comparados aos nanocristais inorgânicos ou nanopartículas de grafeno, sugere-se que a origem de sua fotoluminescência, principalmente daqueles provenientes de bioprecusores, possa estar relacionada com todo o conjunto de fenômenos abordados, ou seja, a variedade de tamanho das nanopartículas, os centros de emissão, os estados moleculares, estados de domínio aromáticos e os núcleos carbônicos.

2.5.3 O Rendimento quântico de fluorescência dos PCs

O rendimento quântico de fluorescência (RQF) é definido como sendo a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvido pela estrutura dos PCs. Atualmente,

considera-se o processo mais adequado para sua estimativa, como sendo o método comparativo entre moléculas padrões fluorescentes e aquelas de RQF desconhecido, desde que a substância padrão a ser usada para a determinação do RQF apresente emissão e absorção em uma região similar à das amostras das quais se deseja determinar o RQF. Dessa forma, admitindo-se que as substâncias em questão, possuam absorbâncias equivalentes para um mesmo comprimento de onda de excitação, pode-se considerar que, ambas absorverão quantidade de fótons, também equivalentes.

No método comparativo são preparadas diluições das soluções de ambas as espécies (padrão e amostra) com absorbâncias decrescentes e inferiores a 0,05 u.a. para se minimizar os efeitos de filtro interno (Tian et al., 2017; Brouwer, 2011). Procede-se então a aquisição dos espectros de absorção e emissão para cada diluição obtida. Calcula-se a área sob a curva para cada banda de emissão encontrada, e em seguida obtém-se para cada espécie, o gráfico a partir dos valores das referidas áreas *versus* máximos de absorção correspondentes. Utiliza-se o método dos mínimos quadrados para se encontrar as equações das retas para cada espécie. Como o valor do RQF do padrão é conhecido, o RQF da espécie desconhecida (Williams, Winfield, 1983) é calculado a partir da equação:

$$\Phi_a = \Phi_p \times \frac{Grad_a \times \eta_a^2}{Grad_p \times \eta_p^2} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: *a* se refere à amostra (PCs), e *p* se refere ao padrão para fluorescência no comprimento de onda estudado (380 nm neste trabalho), η se refere ao índice de refração do solvente (1,33 para a água), Φ corresponde ao RQF, *Grad* se refere à inclinação das equações da reta encontradas para cada espécie.

2.5.4 Absorção molecular

PCs podem apresentar absorção em todo comprimento de onda visível, porém, com um máximo de intensidade absorção na região do ultravioleta (Sun et al., 2006; Baker e Baker, 2010) o que já os torna potencialmente úteis para diversas aplicações envolvendo fotocatalise, sensores e outras (Mirtchev et al., 2005; Wang et al., 2010a; Sun, Du, Wang, 2010).

O método utilizado na rota de síntese pode interferir na absorção óptica dos PCs formados, por exemplo, aqueles produzidos por tratamento a laser mostraram forte absorção em 280 nm (Hu et al., 2009). Zhou e colaboradores (2007), sintetizaram eletroquimicamente

PCs a partir de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, e os mesmos apresentaram absorção máxima em 270 nm. Ahmed e colaboradores (2015), sintetizaram PCs através do método de tratamento hidrotérmico, os quais apresentaram banda de absorção máxima em 367 nm.

As condições de síntese também podem ser responsáveis pelo deslocamento do pico da banda de absorção, como pode ser constatado pela pesquisa de Lu e colaboradores (2009), os quais sintetizaram PCs a partir da esfoliação do grafite na presença de um líquido iônico, de modo que, quanto mais concentrada a solução reagente, mais à direita e mais intensa se apresenta o sinal da absorção dos PCs formados, sendo a absorção mais intensa, para a mistura reacional com apenas 10% de água, distribuída em uma faixa de 280-500 nm.

Larga faixa de absorção também apresentam os PCs sintetizados por Bourlinos e colaboradores (2008a), chegando a alcançar 550 nm. Outros PCs com banda de absorção em faixas mais largas também podem ocorrer em decorrência da funcionalização da superfície e do meio reacional (Peng, Travas-Sejdic, 2009; Li et al., 2012). É comum PCs apresentarem em sua estrutura, uma extensa conjugação de ligações duplas, devido a porções de núcleos poliaromáticos que lhes é típico, em consequência disto, muitas vezes são observadas absorções correspondentes aos sistemas π aromáticos, com transição π - π^* variando de 250-300 nm (Li et al., 2011), e além destas, observa-se também transições n - π^* , caracterizadas pelas duplas ligações entre carbono e heteroátomos, resultando em absorbâncias com banda próxima a 280 nm, são observadas frequentemente na caracterização dos PCs.

2.6 O princípio FRET

Förster estabeleceu pela primeira vez que a energia pode ser transferida eficientemente entre moléculas por um mecanismo de dipolo-dipolo de ressonância em distâncias intermoleculares de até 10 nm. Desde então, o FRET tem sido ativamente aplicado em muitos campos para mais de 40 anos. Uma característica única do FRET é a sua capacidade de detectar, quantitativamente, interações moleculares ao longo de distâncias de dezenas de angstroms (Förster, 1993).

Os requisitos essenciais para a transferência efetiva de energia são: que o espectro de emissão da molécula D e o espectro de absorbância de A se sobreponham adequadamente, e que o rendimento quântico de D (ϕ_D) e o coeficiente de absortividade molar de A (ϵ_A) sejam suficientemente altos (por exemplo, $\phi_D > 0,1$ e $\epsilon_A > 1000$), (Clegg, 1995).

O grau em que os espectros de absorção de A e de fluorescência de B se sobrepõem é referido como a integral de sobreposição espectral (J). As orientações do dipolo de transição do

doador e do receptor devem ser aproximadamente paralelas. Sendo os pares aceitadores e compatíveis, o elemento mais crítico necessário para que o FRET ocorra é a proximidade dos mesmos. Förster (1993) demonstrou que a eficiência do processo pode ser equacionada, e uma forma de se avaliar o fenômeno, é através do cálculo da distância de Förster (R_0) usando a equação 2 (Kundu et al., 2016):

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_y}{128\pi^5 N n^4}} J(\lambda) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: Q_y representa o rendimento quântico do doador, n é o índice de refração do meio, N é o número de Avogadro, $J(\lambda)$ é a sobreposição do espectro de emissão de D, com o de absorção de A, κ^2 é o fator de orientação, que descreve a orientação relativa dos dipolos de transição entre A e D, no espaço, o valor de κ^2 é usualmente 2/3 (Kundu et al., 2016).

A sobreposição espectral é definida pela equação 3:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: $F_D(\lambda)$ é a intensidade de emissão de fluorescência normalizada de D, $\epsilon_A(\lambda)$ é a absortividade molar do aceitador.

2.7 Caracterização dos PCs

Após a síntese e a purificação das nanopartículas, estas devem ser submetidas a ensaios para sua caracterização em termos de propriedades morfológicas e emissivas, de modo que os resultados oriundos de sua aplicação analítica sejam confiáveis e reprodutíveis. Algumas dessas características são consideradas uma “assinatura” do nanomaterial, como a distribuição de tamanhos, o tipo de funcionalização, a morfologia, e a emissão ajustável de fluorescência (Wang et al., 2010b).

Estes ensaios podem ser realizados através de técnicas como: espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-vis), espectrometria de fluorescência molecular,

espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared*, FTIR), a microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*, TEM), e (FRX), espectroscopia por fluorescência de raios X (Jelinek, Ben-Gurion, Sheva, 2017).

2.7.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Uma maneira de se conhecer a funcionalização ocorrida na superfície dos PCs é através da aquisição e análise do espectro de FTIR, o qual pode auxiliar a evidenciar diferentes grupos funcionais presentes na superfície dos PCs, que por sua vez, podem resultar numa série de armadilhas emissivas. Na Figura 5, é apresentado o registro de um espectro de FTIR de PCs funcionalizados com nitrogênio e enxofre, onde foram identificadas bandas (em cm^{-1}) características para os grupos C=O (1.660), O-H (3500), amino (3.000-3.270 e 1.540), C-H (2.970), CH₃ (1.460, 1.330). Os PCs referentes à Figura 5, foram produzidos a partir da carbonização de uma gelatina comercial incolor, composta por 18 aminoácidos diferentes, dentre eles a prolina e a glicina, que possuem grupos funcionais importantes relacionados às propriedades fotoluminescentes das nanopartículas produzidas (Vaz et al., 2015).

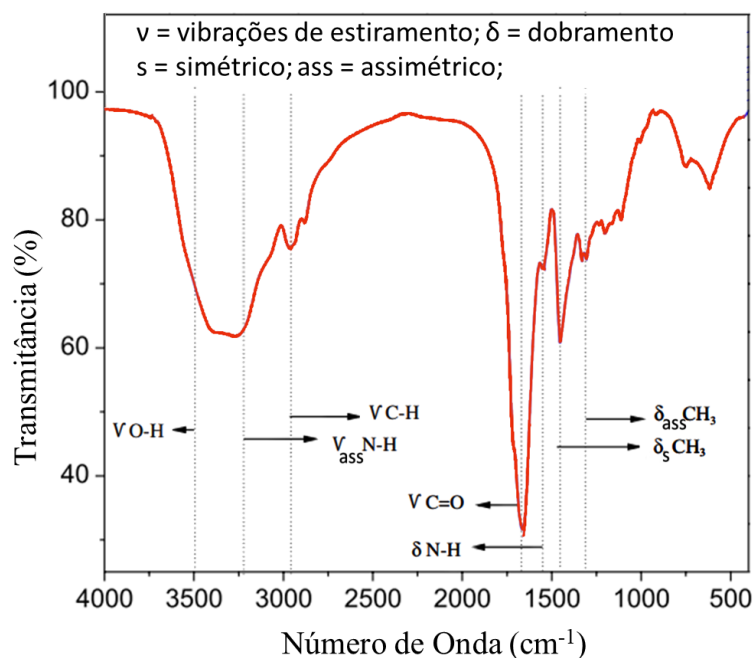


Figura 5 - Imagem de espectro FTIR dos NSPCs, na qual se verifica a presença de alguns grupos funcionais na superfície dos PCs sintetizados a partir de um tipo de gelatina, a 280°C. Adaptada de Vaz et al., (2015).

2.7.2 Espectroscopia de absorção molecular

Após a verificação de que as nanopartículas sintetizadas possuem alguma propriedade fluorescente, quando as mesmas respondem ao serem submetidas à luz negra (~370nm), algumas propriedades ópticas podem ser observadas a partir dos espectros de absorção molecular UV-Vis (Figura 6), neste espectro, referente a PCS derivados de gelatina comercial, composta por mistura de dezoito aminoácidos distintos, são identificadas duas bandas na faixa de 200 a 500 nm.

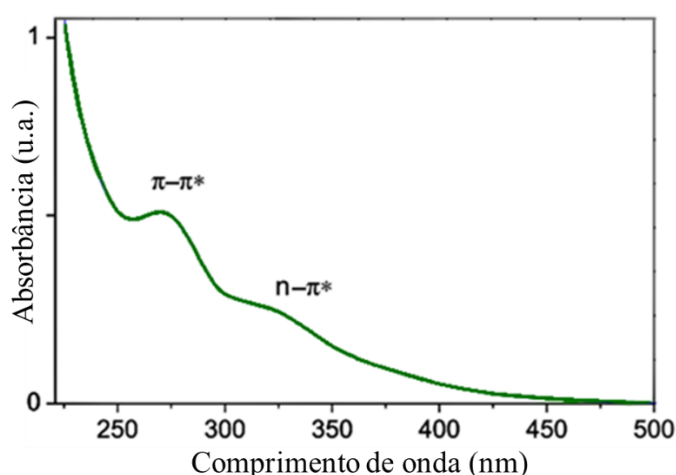


Figura 6 - Espectro de absorção molecular, correspondente aos PCs derivados de um tipo de gelatina comercial, obtidos a 280 °C. A primeira banda (280 nm) correspondente a transições eletrônicas do tipo $\pi-\pi^*$ (relativo a C=C dos anéis aromáticos), e a segunda (325 nm), do tipo $n-\pi^*$, (correspondente a C=O e C-O). Adaptada de Vaz et al., (2015).

A primeira banda (mais intensa) pode estar relacionada a transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ e a segunda, a transições $n-\pi^*$ (Vaz et al., 2015).

2.7.3 Espectroscopia de fluorescência

Na verificação da fluorescência ajustável dos PCs, para cada comprimento de onda de excitação haverá um espectro de fluorescência distinto e um deles apresentará resposta com maior intensidade de fluorescência. Na Figura 7, é apresentado um grupo de espectros de fluorescência de PCs obtidos a partir de gelatina (Val et al., 2015) em função do comprimento de onda de excitação aplicado (λ_{exc}) de 330 a 430 nm.

Nota-se o deslocamento dos máximos de fluorescência para a direita (menores energias) com o aumento do comprimento de onda de excitação (Figura 7).

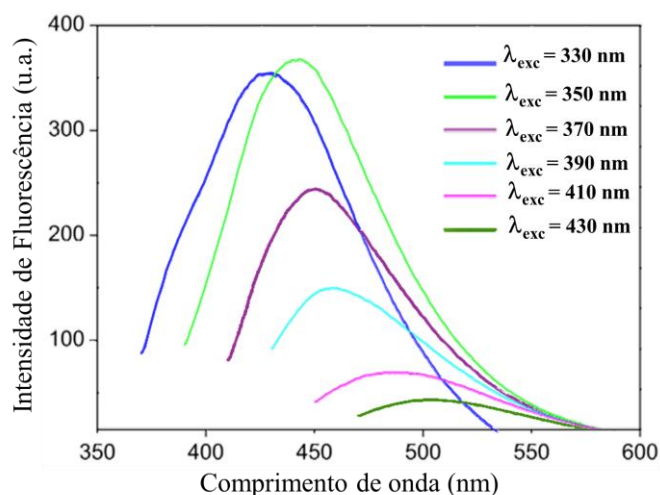


Figura 7 - Espectros de fluorescência de PCs produzidos a partir da carbonização hidrotérmica da gelatina a 280 °C, em diferentes comprimentos de onda de excitação, a maior intensidade de fluorescência ocorre com 350 nm de excitação. Adaptado de Vaz et al., (2015).

O valor máximo de fluorescência foi registrado na excitação em 350 nm, respondendo com luminescência no comprimento de onda de 430 nm (Val et al., 2015).

Assim como mencionado na seção 2.5.2, o deslocamento dos máximos de emissão, dependente do comprimento de onda de excitação dos PCS, tem como causas principais a diversidade de grupos funcionalizados na superfície dos PCs, a distribuição dos tamanhos dos PCs, e os diferentes graus de oxidação das superfícies dos PCs provenientes até da mesma síntese (Dimos, 2016).

2.7.4 Espectroscopia de fluorescência de raios X

A espectrometria de fluorescência de raios X (XRF) é uma técnica analítica não destrutiva e multielementar, que permite a identificação e a quantificação dos elementos constituintes de uma determinada amostra através da detecção de raios X característicos emitidos pelos elementos químicos que a constituem. Nessa técnica, uma fonte de radiação de elevada energia (raios X) provoca a excitação dos átomos da substância em questão e posterior emissão de radiações características, as quais servem para sua identificação.

Análises multielementares qualitativa e quantitativa podem ser realizadas através das técnicas de espectroscopia de fluorescência de raios X por duas categorias, a de dispersão de comprimento de onda (WD-XRF – do inglês, *wavelength dispersive X-ray fluorescence*), e por dispersão de energia (ED-XRF – do inglês, *energy dispersive X-ray fluorescence*).

A diferença fundamental entre as duas técnicas está no tipo de detecção. Na técnica ED-XRF, conhecida também como fluorescência de raios X não dispersiva, é feita a análise do feixe

de raios X emitidos pela amostra, por meio de detectores à base de semicondutores de Si e Ge, capazes de discriminar raios X de energias próximas, medindo suas intensidades, relacionando-as com as concentrações dos elementos (Alexandre e Bueno, 2006; Jenkins, 1981; Jenkins, Gould, Gedcke, 1981).

A essência da técnica WD-XRF é a difração dos raios X característicos provenientes da amostra através de um cristal difrator, que promove o espalhamento em ângulos distintos, fazendo com que alcancem o detector de forma monocromática, separando assim a radiação secundária e permitindo a análise da composição química dos materiais. No sistema de detecção existem filtros que possibilitam a minimização de interferências entre as linhas características da fonte e o sinal de emissão do elemento de interesse. A seleção de comprimentos de onda no detector se dá através do posicionamento preciso em ângulos de espalhamento calculados pela equação de Bragg (equação 4), sincronizados com o cristal difrator, permitindo a máxima eficiência na seleção de linhas de interesse. Além disso, a escolha correta do cristal analisador permite a seleção e separação de uma região específica e muito estreita do espectro de raios X (Jenkins, 1981; Jenkins, Gould, Gedcke, 1981).

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

(Equação 4)

Onde θ é o ângulo de incidência dos raios X, n é a ordem de difração, λ é o comprimento de onda da radiação, e d é a distância interplanar estrutural (Jenkins, Gould, Gedcke, 1981).

A quantificação elementar é possível através da relação entre as intensidades de emissão com a composição das amostras, no entanto, essas intensidades características são influenciadas por diversos outros fatores, como por exemplo, da concentração de outros elementos presentes na matriz amostral, das características da amostra, da configuração do espectrômetro, da eficiência do detector, entre outros (Sitko e Beata, 2011).

Para a análise quantitativa, geralmente utiliza-se a metodologia dos parâmetros fundamentais, que começou a ser desenvolvida através dos estudos de Sherman (Sherman, 1955). Tal metodologia utiliza, além da própria geometria do equipamento, valores experimentais fundamentais, como por exemplo, probabilidades de ejeções de elétrons, rendimento quântico, coeficientes de atenuação relativos a cada elemento e os coeficientes de influência. Tomando-se como base esses chamados “parâmetros fundamentais”, é possível obter estimativas que servem para construção de espectros teóricos que serão usados como referência na avaliação dos espectros reais, de modo que se procedam os ajustes necessários

para obtenção de resultados esperados (Criss, Birks, 1968). Com o desenvolvimento da eletrônica e dos materiais, e consequentemente de equipamentos mais sensíveis e sofisticados, o método dos parâmetros fundamentais encontra-se incorporado em alguns programas em forma de catálogos espectrais.

Para se caracterizar um material em relação ao tipo de organização estrutural de seus constituintes, pode-se utilizar a espectroscopia de difração de raios X (DRX ou XRD – do inglês, *X-ray diffraction*), que se baseia no fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética. As técnicas de dispersão (WD-XRF e DRX), obedecem à equação de Bragg (equação 4), (Bragg, 1912; Jenkins, 1981).

A seguir, as técnicas são comentadas:

2.3.1.1 Espectroscopia de raios X por dispersão de comprimento de onda

Esta técnica descreve a dispersão da radiação em uma rede cristalina. Para a detecção, são utilizados cristais difratores, que separam o feixe de raios X característicos emitidos pela amostra, consequentemente, separam as energias do feixe. É necessário um movimento de alta precisão, sincronizado entre o cristal difrator e o detector. Uma vez selecionado o raio X através do ângulo de espalhamento (2θ) e do cristal difrator, posiciona-se automaticamente o detector na direção do feixe difratado. Na Figura 8, a caracterização elementar de uma amostra é vista na representação gráfica de um espectro parcial de emissão de raios X por dispersão de comprimento de onda, de uma liga metálica.

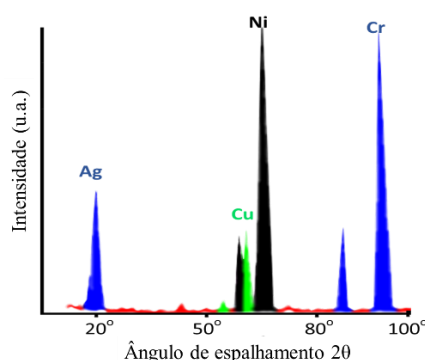


Figura 8 - Espectro de emissão de fluorescência raios X de uma liga metálica, com destaque aos componentes elementares prata, níquel, cobre e cromo, obtido por dispersão de comprimento de onda. Adaptado de Ewing (1972).

Como a separação dos fótons é feita pelo cristal analisador, não há a necessidade de um detector de alta resolução de modo a discriminar os comprimentos de onda ou energias dos raios X emitidos pelos elementos contidos na amostra.

As concentrações dos elementos na amostra estão relacionadas às intensidades dos picos produzidos pela contagem de pulsos, ou número de fótons emitidos por unidade de tempo. Dessa forma, aplicando-se os parâmetros fundamentais, a composição elementar pode ser encontrada (Jenkins, Gould, Gedcke, 1981).

2.3.1.2 Espectroscopia de difração de raios X

A espectroscopia de difração de raios X baseia-se no fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética provocado pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material, causando certos padrões de interferência nas ondas, tornando possível a identificação estrutural da amostra.

É um método rápido e preciso para se identificar as fases cristalinas de um material. Serve para se caracterizar, por exemplo, tanto um composto cristalino (Willard et al., 1981), quanto nanopartículas como os PCs, que geralmente apresentam uma estrutura com um certo grau de desorganização, desencadeada a partir do aglomerado grafítico modificado (He et al., 2017; Jelinek, Ben-Gurion, Sheva, 2017). Nanoestruturas apresentam também regiões grafíticas preservadas, porém, com distâncias interplanares superiores às do grafite puro (0,33 nm), fenômeno atribuído aos grupos funcionais porventura incorporados na superfície dos PCs, intercalando-se nas camadas consecutivas, e enfraquecendo a natureza cristalina das nanopartículas (Jelinek, Ben-Gurion, Sheva, 2017; De e Karak, 2013).

Na Figura 9, é apresentado um perfil típico de difração de raios X, XRD de PCs obtidos a partir de banana (De e Karak, 2013), que se caracteriza por um pico largo em $2\theta = 21,1^\circ$, correspondente ao espaçamento entre as camadas planares dos PCs.

Considerando-se o comprimento de onda (λ) dos raios X, como sendo 0,1542 nm e θ como o ângulo de incidência ($10,55^\circ$ neste caso), de acordo com a Equação 4, a distância interplanar “ d ”, seria 0,42 nm (Fig. 9), superior àquela atribuída ao espaçamento entre as camadas do grafite (0,33 nm). Dessa forma, fica confirmada a fraca natureza cristalina dos PCs em questão. Tal caracterização reforça a hipótese da existência de defeitos de superfície, ou armadilhas emissivas, ao longo da superfície do nanomaterial (George, Bhowmick, 2008).

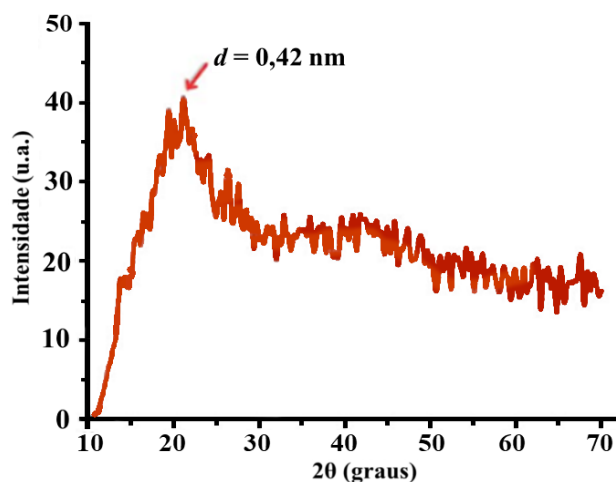


Figura 9 - Difratograma de DRX dos PC produzidos a partir da banana, com um pico em 21,1°, indicando o espaçamento de 0,42 nm entre as camadas do material, superior ao espaçamento entre as camadas do grafite (0,33 nm), indicando baixa cristalinidade dos pontos de carbono, devida aos grupos funcionais superficiais. Adaptada de: De e Karak, 2013.

2.7.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM - do inglês, *transmission electron microscope*) envolve a interação da matéria com um feixe de elétrons acelerados por uma diferença de potencial da ordem de KeV, os quais alcançam comprimentos de onda de dimensões de alguns ângstrons e são controlados por um conjunto de lentes eletromagnéticas em ambiente evacuado, essas lentes têm foco ajustável através de seu “driver de controle”, o que permite variar o seu poder de ampliação, fornecendo dessa forma, informações como imagens, estrutura, e morfologia, relativas à estrutura de nanomateriais analisados (Goodhew, Humphreys, Beanland, 2001).

Os diversos fenômenos envolvidos no bombardeio da amostra pelo feixe de elétrons, como a absorção devida à composição e espessura da amostra, a desaceleração em função da composição elementar do material, a difração quando se trata de materiais cristalinos, reflexão eletrônica, fluorescência de raios X relativa à composição elementar do material, além de contribuírem para a formação normal da imagem, comparados com um simples microscópio óptico, podem fornecer, mediante o uso de determinados detectores, muitas outras informações acerca do material analisado como a estrutura gráfica e a morfologia (Goodhew, Humphreys, Beanland, 2001).

Um microscópio eletrônico de transmissão é composto por três componentes principais, a coluna óptica eletrônica, sistema de vácuo e módulo de controle e registro (Amelinckx et al., 1997; Goodhew, Humphreys, Beanland, 2001).

Na Figura 10, é apresentada uma imagem de TEM de um PC, onde se apresentam as camadas gráficas da nanopartícula, cujos planos cristalinos são visíveis.

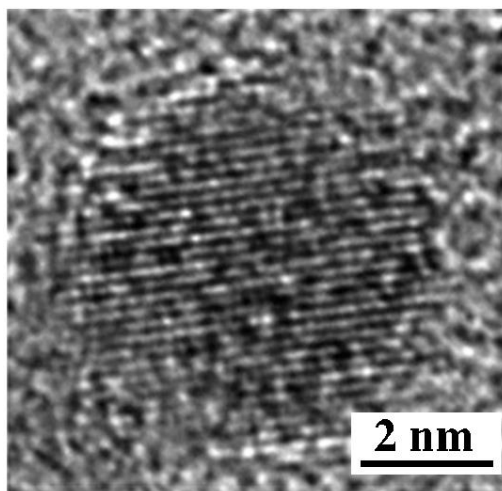


Figura 10 - Imagem de TEM de um PC de dimensão aproximada de 6 nm, cujos planos do carbono grafítico medindo décimos de nanômetros são claramente visíveis, em comparação com a barra de escala que corresponde a 2 nm, Figura adaptada de Jelinek, Ben-Gurion, Sheva, (2017).

Esta técnica permite a visualização estrutural dos PCs de maneira direta, promovendo uma caracterização que fornece importantes informações acerca da morfologia, distribuição de tamanhos, e organização cristalina dos PCs. A análise das imagens obtidas por TEM, evidenciam a presença das pequenas partículas, de formato que pode ser aproximadamente esférico, com a possibilidade de estimativa de distribuição de seus tamanhos (Jelinek, Ben-Gurion, Sheva, 2017).

2.8 A importância das vitaminas

Até o século XIX, o valor nutritivo dos alimentos era relacionado apenas à presença de macronutrientes como açúcares, gorduras, proteínas e alguns minerais, os quais, junto com a água, representavam toda a composição química conhecida (Bobbio e Bobbio, 1989).

Alguns fatos históricos ilustram o problema da nutrição inadequada e os problemas ocorridos, como ocorreu com o explorador português Vasco da Gama, que relatou ter perdido mais de 60% de sua tripulação de 160 marinheiros em sua viagem ao redor do Cabo da Boa

Esperança em 1498. De 1595 a 1597, a frota da companhia das Índias Orientais Holandesas perdeu dois terços de seus marinheiros devido ao escorbuto. Em 1593, o almirante britânico Richard Hawkins escreveu que, durante sua carreira, ele havia visto cerca de 10 mil marinheiros morrendo em consequência do escorbuto (Combs, 2012).

A primeira vitamina descoberta foi a tiamina, no início do século XX, pelo bioquímico polonês e pai da “terapia com vitaminas”, Casimir Funk, a partir da descoberta de um fator “anti-beribéri”, que segundo ele, se tratava de uma amina. Em consequência disto, teria surgido o termo genérico vitamina, ou amina essencial à vida (Gubler, 1991; Bianchini-Pontuschka e Penteado, 2003; Piro et al., 2010). Funk nomeou tal fator de vitamina B₁, em alusão a “fração B” das porções de arroz polido, utilizado nos experimentos. Tal fração teria curado os animais doentes testados, e ao mesmo tempo, estabelecido um marco na prevenção do beribéri, doença deficitária marcada por inflamações, lesões degenerativas dos nervos, sistema digestivo e coração (Piro et al., 2010).

Vale destacar que, antes dos experimentos de Funk, no final do século XIX, já se adotavam precauções alimentares como melhoria na dieta em tripulações de marinheiros embarcados, para se evitar doenças como escorbuto, beribéri, entre outras (Gubler, 1991; Ball, 1998). As vitaminas são nutrientes essenciais à vida, e se diferenciam dos macronutrientes, carboidratos, proteínas, lipídios e minerais pelo fato de serem absorvidas em seu estado orgânico natural, e também, por que funcionam principalmente como catalisadores de processos internos aos organismos, sua atividade se desenvolve com a ingestão de pequenas frações dessas substâncias. Na ausência desses catalisadores, as funções normais do corpo podem entrar em colapso, deixando o organismo suscetível a algumas doenças.

Historicamente, as vitaminas foram agrupadas de acordo com a solubilidade em água e em gordura, e não pela função que exercem, eis que cada uma é responsável por uma ou mais funções específicas. A solubilidade das vitaminas está diretamente relacionada com a absorção de seus vitâmeros (grupos responsáveis pela atividade biológica relacionada à vitamina), ou pelos precursores, que são grupos pró-vitamínicos que após metabolizados pelo nosso corpo, se convertem em vitaminas propriamente ditas. As vitaminas hidrossolúveis compreendem todas as vitaminas do complexo B e a vitamina C. O complexo B totaliza um grupo de oito vitaminas: tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), ácido pantotênico (B₅), piridoxina (B₆), biotina (B₇), ácido fólico (B₉), cianocobalamina (B₁₂) (Lehninger et al., 1993; Zemleni et al., 2006).

As vitaminas do complexo B são transportadas facilmente através do sangue, e seu excesso é excretado dos rins para a urina. Sua absorção se dá ao longo do intestino delgado.

Uma dieta equilibrada deve fornecer quantidades adequadas de cada uma das vitaminas, pois apesar de nosso organismo sintetizar algumas, exceto a niacina, a vitamina D e a vitamina K, ele o faz em quantidades muito reduzidas se comparado com as necessidades diárias mínimas, portanto, a alimentação deverá ser rica e variada em vitaminas, para que o corpo se mantenha equilibrado e em pleno funcionamento (Zempleni et al., 2006).

2.8.1 Considerações acerca da riboflavina

A riboflavina (RF), 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol)isoaloxazina, conhecida também como vitamina B₂, lactoflavina, ovoflavina, hepatoflavina ou vitamina G, é um pó cristalino amarelo-laranja, de sabor amargo e odor leve, utilizada comumente como corante alimentar, possui fórmula molecular C₁₇H₂₀N₄O₆ e massa molar 376,37 g mol⁻¹, moderadamente solúvel em água, dependendo da temperatura (13 mg, a 27 °C e 5 mg, a 7 °C, por 100 mL), relativamente estável ao calor (se decompõe próximo aos 280°C) e à oxidação (Insel et al., 2007; Mack, Grill, 2006).

A RF deve o prefixo “ribo” à cadeia ribitol que a constitui. O termo flavina se refere ao sistema isoaloxazina, o qual apresenta elétrons π conjugados, 2 radicais metil nas posições 7 e 8. Ainda comporta o substituinte ribitol na posição 10 (ocupada pelo nitrogênio), (Edmondson, Ghisla 1999; Mack, Grill, 2006), como é mostrado na figura 11. O sistema isoaloxazina representa a parte redox ativa das flavoproteínas, e proporciona à RF, características como a coloração amarela, e a fluorescência. Nessa cadeia, o xileno (C₆, C₇, C₈, C₉, C_{9a} destacados na Figura 11) possui caráter lipofílico, e a pirimidina, é hidrofílica (N₁, N₃, C₂, C₄, C_{4a} destacados na Figura 11), (Zempleni et al., 2006).

A RF é uma molécula com alta sensibilidade à luz, principalmente em soluções alcalinas, onde é mais solúvel, degradando-se em um composto denominado lumiflavina (Massey, 2000). Como vitamina, executa um importante papel como precursora de coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons, representadas pela Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) e pela Flavina mononucleotídeo (FMN), (Merrill et al., 1981; Powers, 2003; Mack, Grill, 2006; Edmondson, Ghisla, 1999).

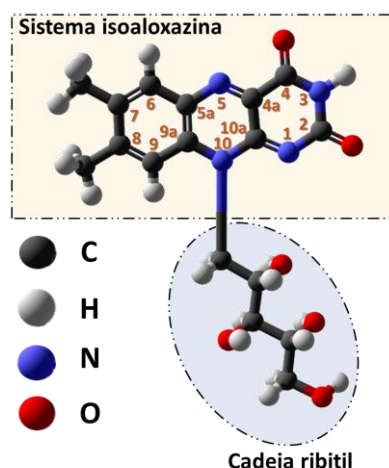


Figura 11 - Representação do tipo *ball-and-stick* da riboflavina (RF) ou 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol) isoaloxazina. Seu anel central e simétrico (pirazina) cujas posições C_{4a} e N₅ constituem os principais responsáveis pela atividade redox da molécula. No detalhe da composição da RF, a Isoaloxazina, que é anfotérica, e abaixo, observa-se cadeia ribitol, de onde vem o termo riboflavina. Figura adaptada de Mack, Grill (2006).

A riboflavina pode ser encontrada em: cervejas, vinhos, fígado, rim, levedo de cerveja, espinafre, berinjela, leite, carnes, ovos, queijos, extratos de leveduras, farelo de trigo, ervilhas. Em grande parte dos alimentos a RF se apresenta como proteína ligada à flavina. As células requerem os derivados da RF para uma variedade de enzimas, relacionadas a reações de óxido-redução, desempenha função vital no catabolismo dos carboidratos e lipídeos em pontos importantes como catálise da reoxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADPH), na catalisação da oxidação do succinato à fumarato no ciclo dos ácidos graxos saturados para insaturados na β -oxidação dos ácidos graxos, e na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa, no catabolismo de aminas biogênicas, bases purínicas derivadas da degradação de ácidos nucleicos, na conversão da vitamina B₆ e ácido fólico a suas formas coenzimáticas e na conversão de triptofano a dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada (NAD⁺), (Zempleni et al., 2006)

Os sintomas de deficiência da riboflavina resultam em: fadiga, lesões labiais, língua seca e avermelhada, atraso no crescimento, desenvolvimento anormal de fetos, conjuntivite e opacidade do cristalino, dermatite seborreica, vermelhidão nos lábios e úlceras na boca, hipersensibilidade à luz, problemas digestivos, degeneração do sistema nervoso, infecções na garganta, perda do ferro no intestino e redução na absorção do ferro, consequentemente anemia hipocrômica e microcítica, a deficiência se associa a determinadas doenças crônicas como diabetes, e à síndrome oral-ocular-genital, cujos sintomas clássicos são estomatite, fotofobia e dermatite escrotal, interferência no metabolismo de outros nutrientes, principalmente de outras vitaminas do complexo B, tais como piridoxina, cianocobalamina e folato, podendo levar o

indivíduo até mesmo à morte (Flore et al., 2008; Piro et al., 2010; Fishman, Christian, West, 2000; Takami, Gong, Amemiya, 2004; Lee, Corfe, Powers, 2013).

O Protocolo nutricional de ingestão diária para a RF, varia por idade e por sexo, e está descrito na tabela 2, no entanto, por consequência da sua fotoinstabilidade (Massey, 2000), o teor desta vitamina contida nos produtos naturais, derivados ou industrializados, apesar de apresentar requerimento diário em miligramas, dependendo das condições de fabricação, do tipo de armazenagem ou exposição, pode variar de maneira significativa. Nessa perspectiva, métodos analíticos eficientes e rápidos são necessários para o adequado controle de qualidade de produtos que contenham esta vitamina.

Tabela 2 - Recomendações dietéticas diárias para a RF.

Idade (ano)	Masculino (mg)	Feminino (mg)	Gravidez (mg)	Lactação (mg)
≤ 0,5	0,3	0,3	-	-
0,6 a 1	0,4	0,4	-	-
1 a 3	0,5	0,5	-	-
4 a 8	0,6	0,6	-	-
9 a 13	0,9	0,9	-	-
14 a 18	1,3	1,0	1,4	1,6
19 a 50	1,3	1,1	1,4	1,6
≥ 51	1,3	1,1	-	-

Adaptada de Pitkin, (1998).

A RF pode ser caracterizada pelo seu espectro medido em solução aquosa, o qual apresenta quatro máximos nos comprimentos de onda de absorção (λ_{abs}) de 222, 266, 373, e 445 nm respectivamente, conforme apresentados na Figura 12 (a), (b), (c), (d). No entanto, outras vitaminas do complexo B, como a tiamina, niacina, cianocobalamina e piridoxina, também absorvem fortemente na faixa entre 200 e 400 nm. Na Figura 12, é apresentada a superposição espectral apresentada pela mistura das vitaminas tiamina, niacina, cianocobalamina e piridoxina em solução aquosa, de modo que, para que se possibilite uma identificação ou quantificação simultânea das mesmas por espectroscopia UV-Vis, se faz necessário, ou a aplicação de uma etapa de separação cromatográfica antes da detecção, ou a utilização de ferramentas para a resolução de misturas multicomponentes (López-de-Alba et al., 2006).

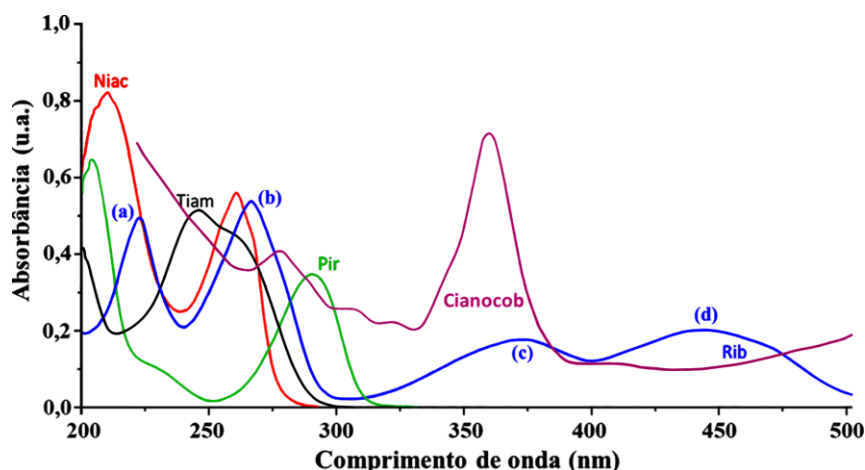


Figura 12 - Representação do espectro de absorção da RF (7 mg L^{-1} , —), com máximos em 222 (a), 266 (b), 373 (c) e 445 nm (d), e sobreposição aos espectros da tiamina (13 mg L^{-1} , —), niacina (15 mg L^{-1} , —), cianocobalamina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$, —) e piridoxina (11 mg L^{-1} , —), (Adaptado de López-de-Alba et al., 2006; Proinsias, Giedyk, Gryko, 2013).

Na Figura 13A, observa-se a representação da distribuição de intensidade de fluorescência da RF em solução aquosa, em que se pode observar três áreas de intensa fluorescência, cujas intensidades máximas se localizam em comprimentos de onda de excitação e emissão (λ_{ex} e λ_{em}) de 270 e 525 nm, 370 e 525 nm, 450 e 525 nm, respectivamente, com uma faixa de emissão entre 500 e 600 nm. Quando excitada a 270 nm, a solução de RF apresenta maior intensidade de fluorescência do que quando excitada a 370 nm ou 450 nm.

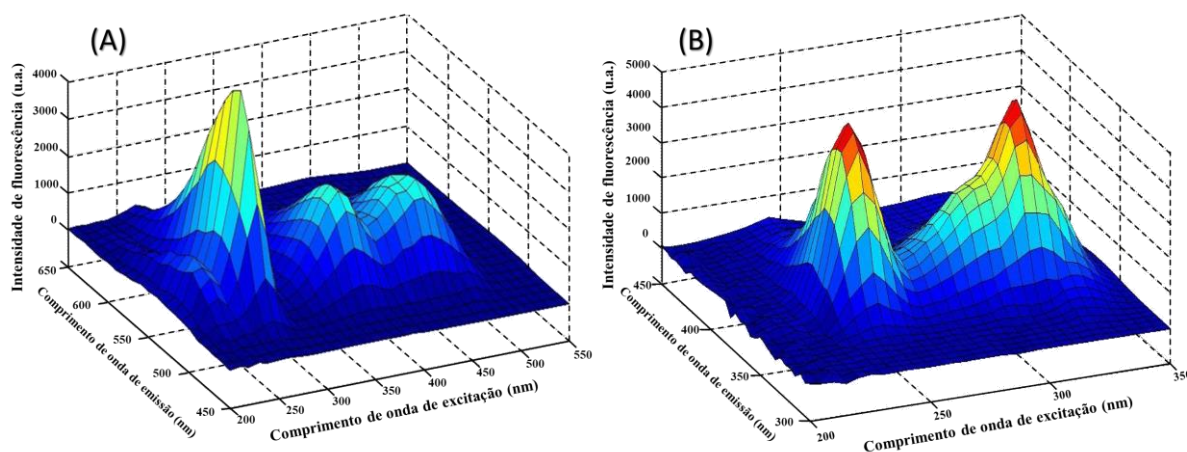


Figura 13 –Representação gráfica da distribuição de intensidade de fluorescência: (A) da RF, com três áreas de intensa fluorescência quando excitada (λ_{ex}) a 270, 370, e 450 nm, apresentando um máximo de emissão a (λ_{em}) de 525 nm. (B) da piridoxina, com duas áreas de intensa fluorescência quando excitada (λ_{ex}) a 240 e 320 nm, com emissão máxima em 370 nm (Adaptado de Hui et al., 2016).

A piridoxina (Figura 13B) possui duas áreas de intensa fluorescência cujos centros com máxima intensidade se localizam em comprimentos de onda de excitação e emissão (λ_{ex} e λ_{em})

de 240 e 370 nm, e 320 e 370 nm, respectivamente e com faixa de emissão entre 330 e 440 nm, de modo que a partir de 350nm de excitação já não existe mais emissão da piridoxina (Hui et al., 2016).

2.8.2 Estabilidade de soluções de RF

A RF é sensivelmente instável quando em solução aquosa, e as espécies não ionizadas de RF são mais suscetíveis à fotólise (pH entre 5,0 e 10,0). Em pH abaixo de 2,0 e acima de 10,0 observa-se taxas relativamente baixas de degradação proveniente de interação com a radiação UV (Berger, Shenkin, Path, 2006; Ribeiro et al., 2011).

A figura 14 mostra o resultado da fotólise com o decréscimo da concentração de RF em função do tempo de exposição de uma solução aquosa de 10^{-4} mol L⁻¹ à radiação UV proveniente de lâmpada de vapor de mercúrio de média pressão e potência de 125 W com emissão na faixa de 313 a 366 nm (Ahmad et al., 2004).

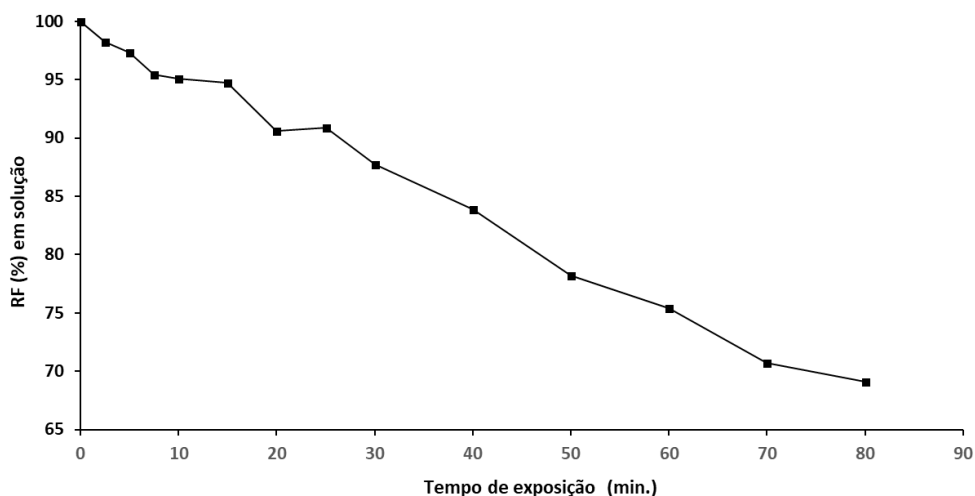


Figura 14 – Degradação de uma solução 10^{-4} mol L⁻¹ de RF e em função do tempo de exposição à radiação UV. Fonte: Ahmad et al., (2004).

Esta característica justifica a recomendação de preparo de soluções de RF para uso imediato, seguida neste trabalho.

A degradação da RF promovida pela luz tem sido amplamente estudada desde sua descoberta na década de 1930. Quer seja em pH ácido ou neutro, a RF se degrada em lumicromo ($C_{12}H_{10}N_4O_2$), e com o pH básico, a mesma irá se decompor em lumiflavina ($C_{13}H_{12}N_4O_2$) e

subprodutos menos importantes, de modo que, após 96 h, 98% de toda a RF pode ser destruída sob luz natural (Choe, Huang, Min, 2005; Sheraz et al., 2014). Nessa perspectiva, a utilização de um sistema automático de análise oferece a vantagem de se minimizar a degradação, uma vez que as soluções contendo RF permanecem protegidas em recipientes escuros ou opacos durante praticamente todo o processo.

A lumiflavina é tóxica, podendo ser diferenciada da RF pelo aparecimento de um “ombro” a 450 nm em seu espectro de emissão, quando excitada a um comprimento de onda de 340 nm, como é mostrado na Figura 15. Sua determinação pode ser realizada pela medida por fluorescência direta após extração com clorofórmio, tal procedimento pode ser utilizado na determinação indireta de RF após sua degradação em lumiflavina (Ahmad et al., 2015).

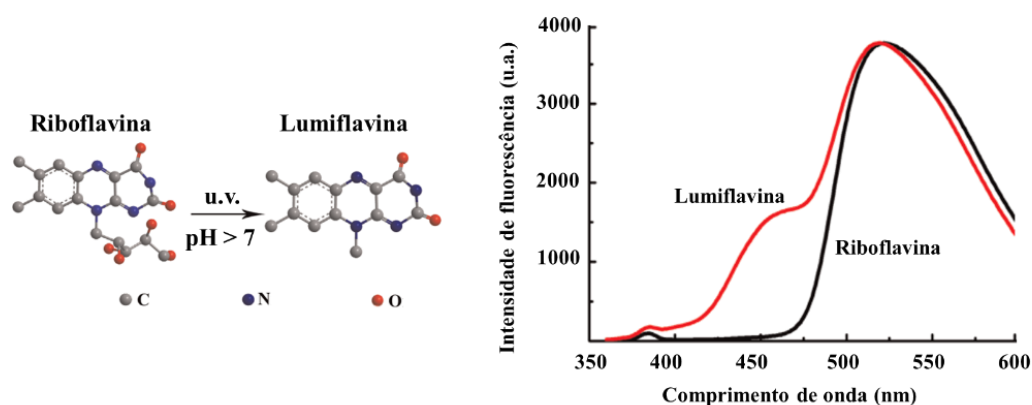


Figura 15 - Representação da degradação da RF em meio básico, sob luz UV (lado esquerdo), e a representação do espectro de emissão da lumiflavina em comparação com o da RF, excitadas em 340 nm, onde apesar de apresentarem uma semelhança em termos de máximo de fluorescência, a lumiflavina se destaca pelo “ombro”, no comprimento de onda de aproximadamente 450 nm, ausente na RF (lado direito), adaptado de Wang et al., (2015a).

Quando a RF é exposta à luz visível ou UV, pode produzir radicais como superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio (Choe, Huang, Min, 2005), e espécies reativas como estas, podem causar degradação em cascata das vitaminas C, A, D, e E (Golbach et al., 2014; King, Min, 1998; Li, Min, 1998; Li, King, Min, 2000).

A RF sofre destruição do anel de isoalixazina em pH acima de 7,0. A intensidade de fluorescência da RF também depende do pH do meio, conforme pode ser visto na Figura 16, que ilustra a representação gráfica da influência do pH sobre a fluorescência em soluções de mesma concentração da vitamina (Scott et al., 1946).

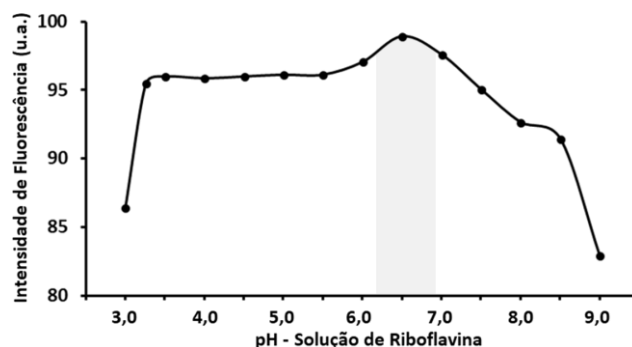


Figura 16 - Influência do pH sobre a fluorescência da RF em soluções aquosas. Pode-se alcançar valores maiores de intensidade de fluorescência, mantendo o pH tamponado próximo da neutralidade (região cinza do gráfico), e conforme o pH vai aumentando, o decréscimo da intensidade de fluorescência é considerável (adaptado de Scott et al., 1946).

2.9 Determinação de riboflavina em suplementos vitamínicos e bebidas

A detecção e determinação da RF em alimentos, produtos enriquecidos, suplementos e bebidas, entre outros, é importante tanto do ponto de vista comercial, que diz respeito ao controle de produção, quanto sob os aspectos de garantia da qualidade dos mesmos.

De maneira geral, produtos alimentícios industrializados, armazenados ou submetidos a condições deletérias, tendem a perder gradativamente importantes níveis nutricionais. Dessa forma, alguns fabricantes buscam enriquecer o seu produto através da adição de vitaminas e outras substâncias, para que seu valor nutricional se mantenha nos padrões (Ball, 1998). Nesse cenário, surgem os problemas relacionados ao controle químico de qualidade, em relação, por exemplo, aos níveis de vitaminas e a necessidade de sua quantificação. Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento e a validação de novos métodos analíticos a fim de se determinar os teores destas substâncias nos produtos em questão, desde o momento de sua armazenagem, até a entrega ao consumidor. Para as vitaminas, os métodos analíticos empregados devem ser os mais seletivos, confiáveis e robustos possíveis (Sharpless, 2000).

Nessa perspectiva, a constante reavaliação dos métodos clássicos, como os microbiológicos, que envolvem alta complexidade, forte dependência do analista, e alta demanda de tempo, tem sido fatores para a evolução dos mesmos, dessa forma, têm-se observado uma intensificação na busca por métodos mais modernos (Ottaway, 1993).

Um estudo realizado na década de 1940 pode ser citado como exemplo dessa busca pelo aprimoramento do conhecimento acerca das propriedades das vitaminas, e diz respeito ao sistema de entrega de leite nas residências dos EUA, relacionando-o com a depleção do teor de RF no mesmo, de modo que, o ato de deixar o material ao relento, recebendo luz natural por algumas horas, traria consequências negativas à sua composição química. O estudo envolveu

um ensaio microbiológico para determinação de RF, em amostras de leite, com quantificação turbidimétrica e acidimétrica, verificando-se uma queda na concentração da RF, diretamente proporcional ao tempo de exposição à luz natural (Snell, Strong, 1939; Ziegler, 1944), concluindo-se que, em média, após 1 hora de irradiação, o teor de RF decresce 32%, e após 2 horas, o decréscimo é de 60% (Ziegler, 1944), atualmente, o problema da fotossensibilidade é enfrentado, de maneira mais comum pelo uso de garrafas de cor âmbar no caso de bebidas, e de embalagens com opacidade à luz.

A modernização e o aprimoramento das técnicas de análise das vitaminas, seus vitâmeros e metabólitos depende da consolidação do total entendimento multidisciplinar acerca das mesmas, o que pode demandar muito tempo, como no caso da vitamina K, cujo período foi aproximadamente de quarenta anos, entre a sua descoberta e a determinação de seu metabólito (Zempleni et al., 2006).

Devido à complexidade e importância da RF no metabolismo animal, a questão metodológica mais adequada em termos de sua determinação química parece estar longe de se esgotar. Diante dessa perspectiva, serão comentados a seguir, alguns dos diversos métodos existentes para determinação de RF, aplicáveis a suplementos multivitamínicos, formulações farmacêuticas, vinhos e cervejas.

2.9.1 Método microbiológico

Uma das análises tradicionais para detecção da RF se dá por via microbiológica, este método baseia-se na proporcionalidade entre a concentração da vitamina e o crescimento populacional do microorganismo que a metaboliza, explorando a sua exigência especificamente pela vitamina de interesse. Desse modo, mantém-se o microorganismo em um meio de cultura, que preencha todos os requisitos de crescimento, exceto o da vitamina, assim, uma resposta em termos de crescimento populacional pode ser gerada para concentrações de vitamina pré-definidas (calibração ou controle). O crescimento pode ser medido fotometricamente ou através do monitoramento da formação de algum metabólito, assim, de posse da resposta, pode-se determinar a concentração da vitamina nas amostras problema, relacionando-a diretamente com o crescimento populacional obtido (Voigt, Eitenmiller, 1985).

O ensaio microbiológico para determinação de RF, pode envolver o “*Lactobacillus casei*” (*L. casei*), que se desenvolve apenas em meio sintético especial, caso o mesmo contenha todos os fatores necessários, inclusive a RF. Trata-se de um método bastante específico haja visto que o “*L. casei*” só apresenta crescimento considerável na presença da RF não

fotodegradada. No entanto, há alguns fatores que tornam o método laborioso e complexo, como o fato de necessitar-se de autoclavagem, ser necessário um meio conservante, constituído de cevada e glicose em solução, e um meio de prova, constituído por peptona fotolisada, cistina, extrato de levedura isenta de RF, glicose e soluções salinas, além do longo intervalo de tempo, necessário para se completar o processo, e as medidas de turvação podem ser realizadas em fotocolorímetro com filtro de 530 nm (Snell, Strong, 1939; Landy, Dicken, 1942).

Outros microorganismos também podem ser utilizados na determinação de RF, como é o caso do "*Lactobacillus rhamnosus*" (Voigt, Eitenmiller, 1985), bem como do "*Bacillus cereus*" mutante, para o qual é aplicado o método da difusão em ágar para quantificação de RF (Salvetti et al., 2003).

Arnold, Lipsius e Greene (1941), aplicaram o procedimento microbiológico para a determinação de riboflavina em diversas fontes naturais e concentradas, inclusive em formulações farmacêuticas, recomendando o método em substituição ao método biológico (curva de crescimento em ratos). Ainda segundo os autores, a especificidade do método foi demonstrada, e as variações encontradas na curva padrão, apresentam valores significativos.

Berg e Behagel (1972), desenvolveram um sistema semi-automatizado, com o intuito de substituir as manipulações laboriosas envolvidas nas determinações microbiológicas de vitaminas, aplicáveis a suplementos e formulações farmacêuticas, quais sejam, preparação de diluições e das misturas de teste nos tubos de cultura, leitura de turbidez e tabulação dos resultados, resultando assim em um aparato para ensaios microbiológicos de RF e outras vitaminas, combinando assim, vantagens do fluxo contínuo para diluição altamente reprodutível de diversas amostras de vitaminas, e preparação dos tubos de cultura, incluindo etapas de dosagem, diluição e incubação, que envolvem a mistura de vitamina e caldo de teste, e o sistema de amostragem discreta para medida da turbidez de grande número de culturas em curto período de tempo. Vale salientar que o sistema exigia, além do tempo de incubação de até 18 horas, grande complexidade de operação, eis que, além das soluções de vitaminas envolvidas, mais cinquenta tipos de outras soluções, entre reagentes e tampões, seriam utilizados.

2.9.2 Cromatografia líquida de alto desempenho

Devido aos rápidos avanços tecnológicos, os métodos cromatográficos têm sido cada vez mais explorados, em substituição aos métodos de detecção de vitaminas considerados clássicos. Dentre estas técnicas mais aprimoradas principalmente pelo uso combinado com ambientes e

aparatos microprocessados, dentre estes, a técnica de separação por Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), e outras técnicas cromatográficas correlatas, podem ser consideradas como sistemas modernos aplicáveis a determinações múltiplas, inclusive de vitaminas, com possibilidade de se utilizar vários tipos de detectores (Mata-Granados, Luque, Quesada, 2004), como por exemplo, espectrometria de massas (Suhara et al., 2005), ou fluorescência (Indyk, Woolard, 2000); UV-Vis (Jin et al., 2012).

A técnica de HPLC de fase reversa apresenta uma coluna com fase estacionária hidrofóbica, com a finalidade de aumentar afinidade por compostos também hidrofóbicos e melhorando sua retenção. Resultados satisfatórios para análise de RF e demais vitaminas, são obtidos através da utilização de colunas cromatográficas compostas por cadeia octadecil (C₁₈). Como a RF, biotina e cianocobalamina são mais hidrofóbicas que as demais vitaminas hidrossolúveis, estas tendem a ficar retidas mais fortemente na coluna (Abano e Dadzie, 2014).

Esta técnica oferece diversas vantagens, como a possibilidade de utilização em praticamente qualquer matriz biológica ou farmacêutica, alta sensibilidade, especificidade e relativa rapidez (Eitenmiller, Landen, 2000). Conta-se como desvantagem desta técnica, a necessidade de utilização de equipamento relativamente dispendioso, pessoal especializado, às vezes demanda relativamente grande de tempo para estabilização do sinal.

Para esta técnica, a detecção por HPLC com detecção por absorção molecular é notadamente o método mais utilizado, seguido pela fluorescência e por métodos eletroquímicos, sendo que estes últimos são utilizados quando as propriedades intrínsecas das vitaminas assim os permitem (Golbach et al., 2014). A seguir, alguns exemplos utilizando HPLC com detecção por absorção molecular e por emissão, são descritos de maneira sucinta.

Andrés-Lacueva, Mattivi e Tonon (1998) desenvolveram um novo método direto e simultâneo de determinação rotineira de RF e seus vitâmeros em vinhos, cervejas e sucos, de modo a buscar uma relação entre o teor de RF na bebida e a degradação do sabor das mesmas.

No caso dos vinhos, poderia haver relação entre sua perda de sabor, com a geração de tiols e dimetilsulfetos quando os vinhos são expostos à luz de comprimentos de onda abaixo de 450 nm. Dessa forma, ocorreria a fotodegradação da metionina e da cisteína em presença da RF, que agiria como um fotosensibilizador. Em cervejas, a fotoativação da riboflavina pode conduzir a diversas rotas de síntese, formando compostos carbonílicos ou mercaptanas, ambos responsáveis pelo sabor desagradável. Um dos principais compostos produzidos é o 3-metil-2-buten-1-ol (MBT). A técnica utilizada foi HPLC-FL de fase reversa, cuja fase estacionária consistiu em uma coluna C₁₈, e os solventes utilizados foram, tampão fosfato pH 3,0 a 0,05

mol L⁻¹, e acetonitrila. A linearidade observada para a RF, foi de 11,12 a 222,46 µg L⁻¹, e limite de detecção de 0,49 µg L⁻¹. O tempo de corrida cromatográfica foi de cerca de 7 minutos. O pré-tratamento dispensado para todas as amostras foi apenas a filtração em membrana micro porosa de 0,22 µm. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados nesta determinação de RF foram de 265 e 525 nm, respectivamente. De modo a evitar picos cromatográficos assimétricos ou em duplicidade, os autores substituíram o metanol e o ácido perclórico pelos solventes descritos, o que levou à melhoria na resposta cromatográfica. o autor alerta para as perdas que podem ocorrer após a abertura das garrafas, chegando a medir a concentração em intervalos regulares de tempo, chegando a observar queda de 30% em algumas horas de exposição ao oxigênio e à luz. Na determinação foram utilizados como solventes: solução A constituído por tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹), levado a pH 3,0 com H₃PO₄, e acetonitrila (solução B). A solução de RF foi preparada mediante diluição com acetonitrila (20%) e solução A (80%). O perfil linear do gradiente de eluição foi programado a uma vazão constante de 0,6 mL min⁻¹, e as frações de injeção foram: 95% de A e 5% de B (0 minutos), 75% de A e 25% de B (8 minutos), 95% de A e 5% de B (12 minutos).

Moreno e Salvadó (2000) utilizaram a técnica de HPLC-UV-Vis com coluna cromatográfica C₁₈ de fase reversa para determinar 8 tipos de vitaminas em formulações farmacêuticas, incluindo a RF. A corrida cromatográfica ocorreu em tempo total de 15 minutos e a RF foi eluída em cerca de 10 minutos. A faixa linear encontrada foi de 2,18 a 17,43 mg L⁻¹, e o limite de detecção de 1,84 mg L⁻¹.

Uma nova aplicação no campo de controle de qualidade na fabricação e conservação de vinhos brancos, foi proposta por Mattivi et al. (2000), na qual foram analisados 85 tipos de vinhos brancos de três países, Itália, Espanha e Eslovênia, através da técnica HPLC-FL, com detecção operando a comprimentos de onda de excitação e emissão de 265 e 525 nm, respectivamente. As amostras foram injetadas diretamente no cromatógrafo após filtração em filtro seringa de membrana de 0,22 µm. foi utilizada uma coluna cromatográfica C₁₈, tendo como solventes o tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹) mantidos a pH 3,0, e acetonitrila. Foram utilizados dois tipos de fases móveis, quais sejam: fase móvel A, composta por tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹) com pH 3,0 e fase móvel B, composta por acetonitrila. A corrida cromatográfica foi realizada segundo os gradientes lineares de injeção da fase A utilizados foram: 95% (0 a 8 minutos), 75% (8 a 12 minutos), 95% (após 12 minutos). Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados para a RF foram de 265 e 525 nm, respectivamente. A determinação foi realizada com o método de adição de padrão. O autor procurou relacionar a concentração de RF com o valor sensorial (sabor) dos vinhos analisados, e verificou que, apesar da possibilidade

de outros compostos como polifenóis, possuem alguma influência na manutenção do sabor dos vinhos, por participarem de reações redox, de maneira geral, pode haver alguma correlação entre os teores de RF e o sabor da bebida. Desse modo, os resultados obtidos, podem servir de base para protocolos de controle de qualidade de vinhos no que diz respeito à deterioração do seu sabor.

Viñas e colaboradores (2004) utilizaram HPLC-FL em fase reversa, com estrutura de coluna cromatográfica com fase estacionária constituída de trimetilsilil-amida para determinar RF em diversos alimentos e bebidas, entre eles, vários tipos de cerveja. Para as cervejas, o pré-tratamento utilizado consistiu apenas na filtração em filtro de poro micrométrico (0,45 μM) antes da injeção no cromatógrafo. A RF presente nas cervejas analisadas é majoritária em relação a seus possíveis vitâmeros. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram respectivamente 270 e 515 nm, o limite de detecção obtido para o método foi de 0,3 ng mL^{-1} , cuja linearidade foi observada na faixa de 1 a 150 ng mL^{-1} e os teores de RF encontrados foram considerados estatisticamente satisfatórios em relação aos valores de referência.

Hucker, Wakeling, Vriesekoop, (2011), analisaram o teor de vitaminas hidrossolúveis e fluorescentes, incluindo RF, foi determinado por HPLC-FL, utilizando-se uma coluna C_{18} (ou ODS, octadecil silanol), em diversas amostras de cervejas, em pH levemente ácido, o tempo total da corrida cromatográfica foi de 25 minutos. Para esta matriz, o pré-tratamento utilizado consistiu na desaeração, seguida de filtração em filtro de poro micrométrico, antes da injeção no cromatógrafo. A determinação alcançou um limite de detecção de 0,6 ng mL^{-1} , com linearidade na faixa de 2,0 a 550 ng mL^{-1} .

Jin e colaboradores (2012) desenvolveram um método de determinação de RF e outras vitaminas em suplementos vitamínicos e minerais, baseado em HPLC, acoplado a um detector UV-Vis de arranjo de diodos, obtendo dessa forma, um limite de detecção para a RF de 0,026 mg L^{-1} , com curva de calibração com faixa linear de 11,52 a 34,56 mg L^{-1} , em uma corrida cromatográfica de 20 minutos. Para a fase estacionária, utilizou-se uma coluna cromatográfica C_{18} de 250mm x 4,6 mm de diâmetro interno, e partículas de dimensão média de 5 μm . A fase móvel foi constituída por solução tampão de dihidrogeno fosfato de amônio (50 mM) e acetonitrila, ajustado a pH 3,0 com ácido fosfórico. A extração da RF se deu com solução contendo 0,5% de hidróxido de amônio (v v⁻¹), e analisada em fase móvel de tampão fostafo-acetonitrila na proporção 85:15 (v v⁻¹), a temperatura ambiente. O comprimento de onda de detecção para RF foi ajustado em 282 nm. O pré-tratamento para as amostras consistiu em

pulverizar, dissolver e sonicar o conteúdo das amostras, e filtrar através de seringa com membrana porosa de 0,22 μm .

Kakitani e colaboradores (2014) desenvolveram um método simultâneo de determinação de várias vitaminas, incluindo a RF em alguns produtos comerciais, incluindo suplementos farmacêuticos, através da cromatografia líquida acoplada a dois analisadores de massas, conhecido como espectroscopia de massas tandem (Noble, 1995), CL-MS-MS (ou LC-MS-MS, do inglês, *Liquid Chromatography-Mass-Mass Spectrometry*). O pré-tratamento utilizado para suplementos multivitamínicos consistiu em dissolução, centrifugação e filtração. A fase estacionária descrita consiste em uma coluna C_{18} multimodo, a qual apresenta fase reversa acrescida de trocadores aniônicos e catiônicos em sua estrutura, com fase móvel consistindo em soluções de formiato de amônio em ácido fórmico, e acetonitrila em ácido fórmico. A técnica forneceu faixa linear no intervalo de 0 a 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, com um tempo total de separação de 15 minutos, sugerindo que a mesma seja aplicável a operações de controle de qualidade em linhas de produção, distribuição e estocagem de produtos diversos.

Para determinação indireta de RF em bebidas, incluindo vinhos e cervejas, através da técnica de HPLC com detecção de fluorescência, Bonamore e colaboradores (2016), utilizaram uma glicoproteína fosforilada, derivada da albumina, encontrada em claras de ovos (proteína RF ligante), a qual possui alta afinidade de reação com a RF em uma razão estequiométrica de 1:1, exercendo efeito de supressão de fluorescência da RF. A linearidade para o método foi observada na faixa de 0 a 500 ng mL^{-1} de RF, com limite de detecção de 5,0 ng mL^{-1} . O pré-tratamento utilizado para as amostras, consistiu na deaeração prévia das cervejas, e na filtração prévia à injeção no cromatógrafo, a partir de filtro seringa de 0,45 μm . E a fase estacionária utilizada foi uma coluna cromatográfica C_{18} de fase reversa, a fase móvel foi mantida a pH 3,0 com tampão fosfato e acetonitrila. Os espectros de excitação e emissão escolhidos foram de 440 e 550 nm respectivamente. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 30 minutos. Nesta metodologia, os autores utilizaram a adição de padrão, e destacam que a emissão total de fluorescência da amostra não é necessariamente considerada diretamente proporcional à concentração de RF, ocasionando um efeito de matriz, porém, a fluorescência da RF seria seletivamente suprimida pela adição da proteína RF-ligante, possibilitando-se dessa forma, encontrar a contribuição exclusiva da RF em termos de Fluorescência, relacionando-a à sua concentração nas amostras.

Sim, Kim e Lee (2016) propuseram uma abordagem de análise de vitaminas hidrosolúveis, incluindo RF, em suplementos multivitamínicos, utilizando HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) e MS. O Fator de retenção da RF na coluna cromatográfica (C_{18})

se mostrou praticamente independente do pH do meio, como foi demonstrado pelos modelos de eluição obtidos pelo fator de retenção normalizado (k'), testado para cada vitamina a partir da equação 5:

$k' = (t_r - t_0)/t_0$	(Equação 5)
------------------------	-------------

Onde t_r é o tempo de retenção para a vitamina investigada, t_0 é o tempo morto, determinado pela injeção de metanol. A corrida cromatográfica demandou o tempo de 35 minutos. Para extração das vitaminas nos suplementos, observou-se que tanto o acetato de amônio quanto a água deionizada eram suficientemente eficientes. O procedimento consistiu em pulverização dos comprimidos multivitamínicos, seguido de pesagem e transferência para frasco volumétrico, seguida de diluição com acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ (pH 6,8), agitando-se por 30 minutos, e recolhido a local protegido da luz e refrigerado. Os extratos foram previamente filtrados em filtro seringa de 0,45 µm de porosidade antes da injeção na coluna cromatográfica. O pH escolhido para a fase móvel foi de 3,9. Foram utilizados dois tipos de fases móveis, quais sejam: fase móvel A, composta por formiato de amônio (10 mmol L⁻¹) com pH 3,8 ajustado com ácido fórmico, e fase móvel B, composta por metanol. A corrida cromatográfica foi realizada a uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹. Os gradientes lineares de injeção da fase B utilizados foram: 3 a 15% (0 a 9 minutos), 15 a 20% (9 a 10 minutos), 20 a 25% (10 a 20 minutos), 25 a 55% (20 a 30 minutos). Em seguida, a coluna foi equilibrada com 3% de B, por 15 minutos. O comprimento de onda utilizado para a detecção (DAD) para a RF foi de 268 nm. O limite de detecção encontrado para a RF foi 0,9 µg kg⁻¹. A faixa linear da curva analítica estabeleceu-se entre 0,05 a 25,0 mg kg⁻¹. A exatidão do método foi testada em relação a materiais de referência certificados, verificando-se a consistência entre os resultados, de modo que, não havendo discrepâncias estatísticas significantes, os autores concluíram que o método pode ser incluído na determinação rotineira de vitaminas hidrossolúveis em suplementos multivitamínicos. Neste trabalho, o método proposto por Sim, Kim, Lee, foi utilizado como referência.

2.9.3 Métodos espectrofotométricos na região UV-Vis

A maioria dos métodos espectrofotométricos relatados para a RF pode apresentar algumas desvantagens como sobreposição de bandas e picos, necessidade de síntese de reagentes com alta demanda de tempo, uso de sistemas não aquosos, necessidade de

aquecimento ou extração, estabilidade do produto colorido formado, entre outros (Ashraf et al., 2014), dentre estes métodos, alguns são comentados a seguir:

Hashmi e colaboradores (1968), propuseram um novo método para determinação da RF em comprimidos e injeções de multivitamínicos, que consistia na reação desta com o complexo cloreto cúprico de trifenilfosfina em meio alcalino, produzindo uma substância de cor amarelada com absorbância máxima na faixa de 460 a 665 nm. O produto possuiria um limite visual de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo específico para a RF. O limite de detecção alcançado foi de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com linearidade entre 0,1 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RF. Este método possui alguns inconvenientes como, a intensidade da cor, que se mantém por apenas 10 minutos, e em relação ao reagente, que deve ser previamente sintetizado a partir da trifenilfosfina, uma substância prejudicial ao sistema nervoso e vias respiratórias.

A RF possui uma alta afinidade pelo cátion Ag^+ na faixa de pH de 6,7 a 7,1, formando um complexo vermelho ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_4\text{Ag} \cdot \text{H}_2\text{O}$), com o grupo carbonila, o qual pode ser confirmado com a ausência da banda 1.725 cm^{-1} no espectro infravermelho do material formado (MacPherson, Ottaway, 1978), o complexo possui forte absorção em 520 nm, a utilização desta reação para determinação da RF foi reportada pela primeira vez por Barakat e Badran (1951), os quais, considerando a imprecisão do método direto utilizando fluorescência, quando na presença de outras substâncias também fluorescentes, como em fluidos biológicos e em extratos de levedura, propuseram a exploração desta técnica, realizando o tratamento da solução contendo RF com nitrato de prata a 10 % (m v^{-1}), em meio neutro. Tal determinação envolveu além do uso da prata, o mercúrio (III). Duas décadas depois, Macpherson e Ottaway (1978), utilizaram a mesma técnica para determinação de RF em leveduras, obtendo uma faixa linear de 0 a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Vale salientar que, quase meio século após a primeira exploração deste método, um sistema de análise automático foi adaptado para sua utilização na determinação de RF em complexos multivitamínicos e fármacos, descrito em mais detalhes no item 2.9.2 (Aniceto et al., 2000). em 2003, o mesmo método foi ampliado e utilizado na determinação sequencial de RF e mais três outras vitaminas hidrossolúveis em suplementos multivitamínicos, obtendo para a RF uma resposta linear na faixa de 0,50 a $8,00 \text{ mg L}^{-1}$ (Rocha, Filho, Reis, 2003).

A RF pode ser determinada espectrofotometricamente em preparações farmacêuticas através de reação da RF com o complexo formado entre o cloreto cúprico e os grupos amino presentes na poliamina espermina, originando composto colorido com absorbância máxima a 520 nm, cuja linearidade se apresenta na faixa entre 0,1 e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (Ashraf et al., 2014).

Mohamed e colaboradores (2010) utilizaram ferramentas quimiométricas aplicadas a espectroscopia UV-Vis, na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm, para determinar o teor de vitaminas suas misturas quaternárias sem separação prévia, incluindo RF, aplicável a formulações farmacêuticas, obtendo linearidade entre 2,5 e 90 mg L⁻¹.

2.9.4 Métodos fluorimétricos

A determinação da RF por métodos fluorimétricos é possível porque a mesma apresenta alta fluorescência na região de 440 nm a 500 nm, quando exposta à luz, e a intensidade dessa fluorescência é proporcional à concentração de riboflavina na solução examinada (Golbach et al., 2014).

Nesses métodos, não há necessidade de se realizar derivatização, devido à fluorescência natural da RF. No entanto, havendo a presença simultânea de RF e piridoxina como é o caso dos suplementos vitamínicos, a faixa de excitação de aproximadamente 250 a 350 nm pode resultar em sobreposição dos espectros de fluorescência das mesmas (Hui et al., 2016), podendo acarretar em erros na interpretação das medidas. A espectroscopia de fluorescência sincronizada de ângulo variável, combinada com artifícios matemáticos pode ser utilizada em determinações simultâneas em produtos farmacêuticos comerciais nos quais ocorram sobreposições do tipo, resultando numa identificação mais confiável (Sotomayor et al., 2008). A técnica descrita acima foi utilizada por Clark e colaboradores (1985), com sucesso apenas na determinação de tetraciclina em presença de RF, sem obter êxito na determinação desta última.

Mohamed e colaboradores (2011) relatam a determinação de RF em preparações farmacêuticas comerciais, e em misturas quaternárias de vitaminas, incluindo piridoxina. A detecção destas duas vitaminas envolveu λ_{exc} , e λ_{em} de 457, 527; 325, 415 nm, respectivamente. Apesar da excitação de 325 nm provocar fluorescência tanto na RF quanto na piridoxina, o autor relata a linearidade obtida na faixa de 10 a 120 ng mL⁻¹, e limite de detecção de 2,00 ng mL⁻¹.

García e colaboradores (2001) fizeram uso da técnica de espectroscopia de fluorescência síncrona (SFS), para determinação de três vitaminas, incluindo a RF, em preparações farmacêuticas sólidas e líquidas, obtendo limite de detecção de 9 µg L⁻¹ para a RF. O método de adição de padrões foi adotado para determinação das vitaminas nas amostras, obtendo-se uma faixa linear para a curva analítica de 12,0 a 719,0 µg L⁻¹. Para alcançar um meio de dispersão micelar, as alíquotas foram dissolvidas em presença do surfactante bis-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio (AOT), a uma concentração de 3×10⁻⁴ mol L⁻¹.

Há a possibilidade de se utilizar um método indireto para determinação da RF. A lumiflavina é formada a partir da irradiação da amostra contendo RF sob condições alcalinas (Ahmad et al., 2015; Wang et al., 2015a). Em seguida, após extração com clorofórmio, realiza-se a medida fluorimétrica. Apesar da utilização deste solvente tornar o procedimento um tanto incomum, pode ser uma alternativa de remoção de compostos interferentes de certas matrizes mais complexas, eliminando problemas de seletividade encontrados em algumas análises de RF (Eitenmiller, Landen, 2000).

2.9.5 Métodos eletroquímicos

Devido a sua importância biológica, o comportamento da RF tem sido bastante investigado eletroquimicamente, dentre os métodos, aqueles baseados em voltametria são os mais frequentes em ensaios envolvendo RF, pelo fato dos mesmos serem relativamente simples, de baixo custo e não demandar muito tempo de análise. No entanto, a necessidade de limpeza e de ativação prévia podem ser consideradas como desvantagens. Outro problema que às vezes ocorre é a baixa reprodutibilidade no resultado analítico (Brezo et al., 2015; Qijin et al., 2001).

O primeiro estudo envolveu preparações multivitamínicas, através da técnica de polarografia de pulso diferencial, com eletrodo de gota pendente de mercúrio, onde se descobriu que a RF sofre redução eletroquímica em meio ácido, produzindo a leucoflavina, ilustrada na Figura 17. Com limite de detecção de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$, os resultados foram satisfatórios a uma concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de RF (Lidquist, Farroha, 1975).

O comportamento da RF e do ácido fólico a partir da técnica de voltametria de onda quadrada em eletrodo de gota pendente de mercúrio foi utilizado por Çakir, Atayman, Çakir (1996) para determinação das mesmas, em preparações farmacêuticas. Nesta técnica, o fenômeno de redução eletroquímica da RF (Figura 17) também foi explorado.

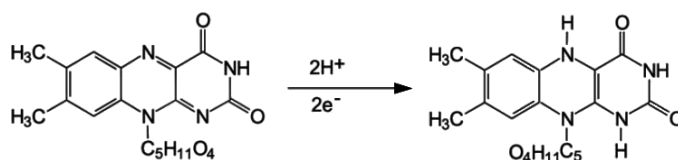


Figura 17 - Representação gráfica do mecanismo de redução eletroquímica da RF em meio ácido, sua forma reduzida é conhecida como leucoflavina (Adaptada de Brezo et al., 2015).

Foi possível a detecção da RF a uma concentração de $2,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, alcançando taxa de recuperação de 98% com desvio relativo padrão na faixa de 2,0 % no estudo do

comportamento voltamétrico aplicado ao processo de redução eletroquímica da RF em meio ácido (Figura 17).

A partir do eletrodo de ouro modificado com L-Cisteína, Qijin e colaboradores (2001) obtiveram uma relação linear entre a concentração do analito e a magnitude da corrente obtida no processo, dessa forma, determinaram o conteúdo de RF em suplementos, com limite de detecção de $2,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$, e linearidade na faixa de $5,0 \cdot 10^{-11}$ a $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Brezo e colaboradores (2015) desenvolveram um método cronopotenciométrico para determinação de RF em preparações farmacêuticas, usando eletrodo de carbono vítreo, baseado na já descrita eletrorredução da vitamina, a -0,12 V. Obtendo assim, uma faixa linear entre 0,2 e 2,0 mg L⁻¹ com limite de detecção de 0,076 mg L⁻¹.

Bandžuchová e colaboradores (2012) realizaram a detecção de RF em preparações farmacêuticas através da técnica de voltametria de pulso diferencial, alcançando um limite de detecção de $1,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, com linearidade observada de 20 a 160 nanomol L⁻¹.

A técnica voltamétrica de redissolução adsorptiva de onda quadrada utilizando como sensor um eletrodo de filme de bismuto, foi aplicada na análise de RF em preparações farmacêuticas polivitamínicas do tipo solução oral, xarope e comprimido, obtendo limite de detecção de 0,1 µmol L⁻¹, e linearidade de 0,3 a 0,8 µmol L⁻¹ (Sa et al., 2015).

2.10 Aplicação de PCs na determinação de vitaminas

Alguns PCs podem apresentar sensibilidade a vitaminas, como ocorre na quantificação da vitamina B₁₂ a partir de PCs obtidos a partir da carbonização do ácido cítrico (200 °C, 30 minutos), os quais mostraram variação em sua fluorescência na presença desta vitamina, observando-se uma resposta linear na faixa de concentração de 1,0 a 12,0 µg mL⁻¹, e limite de detecção menor que 0,1 µg mL⁻¹ (Wang et al., 2015b).

PCs obtidos de maneira similar ao exemplo anterior, porém com tempo de síntese de 5 horas, quando em presença da vitamina B₁₂ apresentaram decréscimo em sua intensidade de fluorescência proporcional ao aumento da concentração desta vitamina, observando-se uma relação linear numa faixa de concentração de 0,5 a 60,0 µmol L⁻¹ e limite de detecção de 0,1 µmol L⁻¹ (Ding et al., 2018).

PCs produzidos através de irradiação por micro-ondas (900 W, 5 minutos) de ácido ascórbico (vitamina C), demonstraram sensibilidade ao próprio ácido ascórbico (Vitamina C), ao recuperar a fluorescência de uma solução de PCs previamente tratada com íons Ferro(III),

exibindo linearidade na faixa de 0,2 a 284,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$ desta vitamina (Gong, Lu, An, 2015).

A partir de precursores ácido cítrico e dietilenotriamina, PCs foram preparados através de aquecimento em banho de óleo (170 °C, 30 minutos), mostrando sensibilidade à vitamina C, a qual restaura a fluorescência dos mesmos, extinta após tratamento prévio com solução de íons Cromo(VI), apresentando linearidade na faixa de 0,03 a 0,10 mmol L^{-1} (Zheng et al., 2013).

PCs produzidos através da irradiação por micro-ondas (800 W, 1 minuto) de água de coco em meio etanólico, foram utilizados na quantificação de tiamina (vitamina B₁), através da recuperação da fluorescência extinta após tratamento prévio com solução de Cu(II), observando-se uma faixa linear de resposta entre 10 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e limite de detecção de 280 nanomol L^{-1} (Purbia, Paria, 2016).

PCs sintetizados a partir do tratamento hidrotérmico da mistura de ácido cítrico e aminopropil trietoxisilano, em seguida submetidos a um revestimento com uma mistura de tetraetoxisilano e ácido nicotínico, com a posterior retirada do ácido nicotínico (vitamina B₃) por extração, resultaram em uma ferramenta de detecção baseada em impressão molecular, sensível ao ácido nicotínico, cuja presença provoca uma diminuição na fluorescência dos PCs, apresentando uma faixa linear de quantificação de 0,5 a 10,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção de 12,6 nanomol L^{-1} (Zuo et al., 2016). Pontos de Carbono preparados por irradiação por micro-ondas, em seguida misturados com NaF de modo que sua fluorescência fosse ampliada, apresentaram diminuição na fluorescência quando em presença de ácido retinóico, proporcional à concentração do mesmo, exibindo uma linearidade de 0,39 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 7,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da vitamina (Majumdar et al., 2018).

PCs produzidos a partir de tratamento hidrotérmico da mistura de ácido cítrico, polietileno-poliaminas, e poli(etileno glicol)bis(amina), (200 °C, 5 horas) e em seguida funcionalizados com com biotina, foram utilizados na quantificação da biotina, em uma faixa linear de concentração de 0,5 a 100,0 ng mL^{-1} , e limite de detecção de 0,1 ng mL^{-1} . O processo baseia-se na imobilização preferencial da biotina com o produto comercial (magnético), Dynabeads® funcionalizado com streptavidina, de modo que, ao se aumentar a concentração de biotina no meio, diminui-se a quantidade de PCs imobilizados no reagente, e consequentemente a intensidade de fluorescência observada após a separação e a retirada das substâncias imobilizadas (Yao et al., 2017).

Wang e colaboradores (2015a) utilizaram PCs de dimensão média de 8,2 nm, sintetizados a partir de ácido cítrico e L-cisteína por processo hidrotérmico (secagem por 4 h a 90 °C e

síntese a 200 °C, 3 h), para a quantificação de RF obtendo faixa linear de concentração de $5,6 \times 10^{-7}$ a $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, e limite de detecção de 1,9 nanomol L⁻¹ de RF.

Wang e colaboradores (2017) utilizaram PCs sintetizados a partir de ureia e citrato de sódio, aquecidos a 180°C, por 1 hora em forno mufla, para a quantificação da riboflavina em suplementos, obtendo-se uma faixa linear de concentração de 0,045 a 2,98 µmol L⁻¹, e limite de detecção de 0,88 nanomol L⁻¹ para a vitamina, em um processo de atenuação proporcional e linear à concentração da mesma, através de FRET entre os PCs (doador) e a RF(aceitador). Verificou-se também que os PCs apresentavam eletroquimiluminescência, ou seja, luminescência produzida a partir de reações eletroquímicas, seguida da formação de íons de radicais livres de alta energia na superfície dos eletrodos, promovendo espécies químicas a estados excitados, de modo que, as mesmas, ao retornarem ao estado fundamental, o façam com a emissão de luz (Xu et al., 2014; Miao, 2008).

PCs dopados com nitrogênio e enxofre, produzidos por tratamento hidrotérmico de uma mistura de ácido cítrico e L-cisteína, aquecida a 200° C durante 3 horas, e em seguida, neutralizada com NaOH, apresentaram a característica de doadores em um processo de FRET envolvendo a RF, de modo a serem utilizados para determinação fluorimétrica da mesma em solução aquosa, através de FRET, apresentando limite de detecção de 1,9 nanomolar, e linearidade na faixa de concentração de 0,56 a 7,44 µmol L⁻¹ (Wang et al., 2015a).

O fenômeno FRET, envolvendo riboflavina e nanopartículas fluorescentes derivadas do grafeno, foi abordado por Kundu em duas ocasiões (Kundu et al., 2013; Kundu et al., 2016). Utilizou-se também PCs derivados de substâncias sintéticas (Wang et al., 2015a; Wang et al., 2017).

Nessa perspectiva, é pertinente a pesquisa em torno de PCs com características e aplicação semelhantes para a detecção da RF produzidos através de rotas mais simples e menos dispendiosas, como por exemplo, utilizando bioprecursores disponíveis regionalmente e um método rápido como a irradiação por micro-ondas caseiro, de modo que se alcance o ineditismo requerido com os resultados satisfatórios.

2.10.1 Sistemas automáticos de análise

Com a crescente inovação tecnológica, culminando no desenvolvimento de novas substâncias e na implementação de suas diversas aplicações cotidianas, muitas das quais, imprescindíveis aos padrões atuais de qualidade de vida, surge também a necessidade de atualização e inovação de métodos analíticos, os quais atendam às exigências sempre crescentes

de confiabilidade, exatidão e precisão do método no menor tempo de análise possível. Dessa forma, muitas estratégias analíticas se voltaram para a automação, e por conseguinte, a miniaturização e simplificação de sistemas (Kellner et al., 2004; Zagatto, Oliveira, Collins, 1999).

Neste cenário, a automação de procedimentos analíticos tem crescido vertiginosamente desde os anos 70, contando cada vez menos com a participação humana durante o processo analítico, resultando na produção de sistemas de análise em blocos ou módulos, quais sejam elementos acoplados de maneira complementar, que atendam à finalidade de determinação analítica de substâncias problema, a partir de um processo reconhecido, os quais de acordo com a IUPAC (1989), envolvem a introdução de uma amostra ou reagente em um fluxo contínuo por meio de um dispositivo de resposta rápida.

Os sistemas automáticos de análise tiveram seu início no final dos anos 50, com a introdução de um sistema em fluxo segmentado por bolhas gasosas (SFA – do inglês, *Segmented-Flow Analysis*) proposto por Skeggs (1957). Tais sistemas se tornaram disponíveis comercialmente, o que pode ser considerado um marco para a automação dos processos químicos devido a integração de algumas etapas operacionais, conforme pode ser visto na Figura 18, representando uma unidade amostradora Technicon Autoanalyzer™, fabricada pela empresa homônima. O aparelho possui internamente uma bomba, um banho de aquecimento, um dialisador, um fotômetro e um registrador gráfico (Skeggs, 1957; Staden, 2015).

No início da década de 1950, os métodos manuais de análises bioquímicas, já não davam conta de atender a crescente demanda, principalmente por análises de sangue e de urina. Nessa perspectiva, havia a justificativa de criação e comercialização de um aparato que apresentasse resultados práticos, como a melhoria considerável da frequência analítica (até 60 determinações por hora), e que operasse com custos de análise sensivelmente menores. Uma prova do sucesso dessa ideia de automação, se constitui em mais de 500.000 aparelhos vendidos, e modelos similares podem estar em plena utilização ainda hoje (Staden, 2015; Skeggs, 1957).

Os sistemas automáticos foram evoluindo, até a obtenção de um conceito no qual alíquotas das amostras seriam inseridas em um fluido transportados não segmentado por bolhas de ar, ou seja, as medidas passam a ser realizadas em fluxo contínuo (Nagy, Feher, Pungor, 1970; Stewart, Beecher, Hare, 1976; Ruzicka e Hansen, 1975), tal abordagem se consolidou como sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA – do inglês, *Flow Injection Analysis*).

Com o passar do tempo, muitas variantes tem sido propostas, tais como: análise em fluxo monossegmentado (MSFA – do inglês, *Monosegmented Flow Analysis*), análise por injeção sequencial (SIA – do inglês, *sequential injection analysis*), (Ruzicka, Marshall, 1990), análise

em fluxo multicomutado (MFA – do inglês, *Multicommuration in Flow Analysis*), (Reis et al., 1994). E análise fluxo-batelada (FBA – do inglês, *Flow-Batch Analysis*), (Honorato et al., 1999).

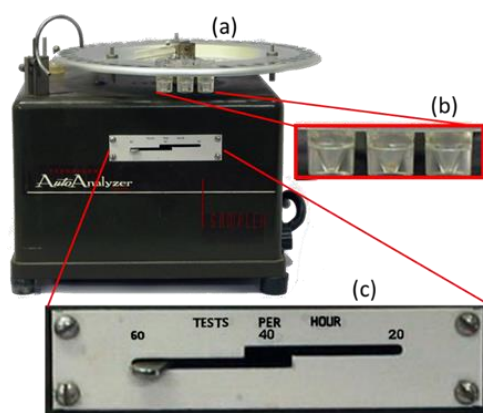


Figura 18 - Aparelho de análise automática introduzido por Skeggs (1957). O componente no destaque (a) é uma mesa giratória de amostragem, na qual as amostras seriam depositadas em pequenos recipientes de vidro, com fundo interno cônico (b), a frequência analítica está indicada (c). Imagem adaptada do sítio www.chemheritage.org.

Diferentes combinações entre aspectos como o transporte e a injeção de fluidos, entre outros, são os fatores principais, que diferenciam e definem estes sistemas, sem que no entanto a sua conformação geral, que é comum a todos os sistemas e envolve de modo geral as etapas de propulsão e injeção dos fluidos, mistura ou separação, detecção.

Diante dessa perspectiva, os métodos automáticos vem sendo estudados e adotados por grande parte dos pesquisadores em química analítica, como instrumentos complementares às análises tradicionais, de modo que, a partir dos mesmos, se minimizem os erros humanos, além de promover uma melhoria na frequência analítica, economia substancial de reagentes utilizados, geração de quantidades menores de resíduos, e dessa forma, resultando em métodos analíticos mais sensíveis e reprodutíveis (Trojanowicz, 2008).

Nos sistemas automáticos, fatores como: dispersão e vazão fluídica, volume de injeção, dimensionamento de bobinas de reação, diâmetro interno da tubulação de recalque, e outros, devem ser controlados e adaptados às análises requeridas (Zagatto et al., 2002; Ruzicka, Hansen, 1988).

Nas últimas décadas, uma parcela importante da Química Analítica tem-se voltado para o desenvolvimento em automação de sistemas, e as adaptações metodológicas requeridas para tal finalidade (Facchin, 1996). Nessa perspectiva, classificam-se os sistemas automáticos como sendo em batelada, robotizados e em fluxo, destacando a demanda crescente por este último,

em automação de processos laboratoriais, e na implementação de novos métodos analíticos (Facchin, 1996, Kolev, Mckelvie, 2008).

2.10.2 Sistemas automáticos de análise aplicados a vitaminas

Um típico sistema de análises por injeção em fluxo envolvendo zonas coalescentes (Aniceto, et al., 2000), para determinação automática de Riboflavina utilizando um injetor proporcional (comutador), é mostrado na Figura 19. O mesmo se encontra na posição de injeção simultânea da amostra e da solução carreadora, até que as mesmas confluem no ponto X. O reator B proporciona a formação do complexo colorido necessário para detecção espectrofotométrica da vitamina. Onde: A corresponde a soluções de referência ou amostras, L_1 e L_2 são as alças de amostragem, C_1 e C_2 , se referem à solução de transporte da amostra e do reagente, E, espectrofotômetro, X, ponto de confluência e B, reator helicoidal, D, descarte. No esquema, se omitiu propositalmente o sistema de propulsão.

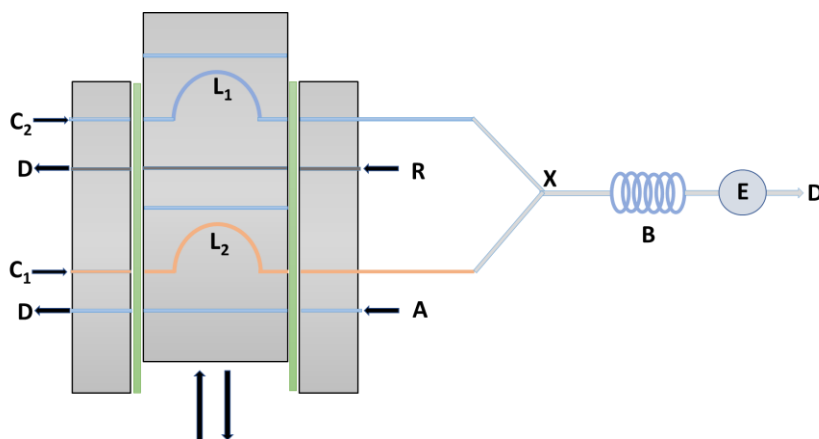


Figura 19 - Diagrama de um sistema automático para determinação espectrofotométrica de Riboflavina. Os retângulos representam um injetor proporcional, e A, soluções de referência ou de amostra; L_1 e L_2 , alças de amostragem de 250 μ L, R reagente (AgNO_3), C_1 e C_2 , solução de KNO_3 , transportador da amostra e do reagente, E, espectrofotômetro (520 nm), X, ponto de confluência, B, reator helicoidal, D, descarte, as setas indicam o movimento da peça em funcionamento. Ilustração adaptada de Aniceto, et al., (2000).

Nesse cenário, a análise em fluxo pode ser entendida de maneira geral, como a introdução rápida de uma amostra, em um fluxo contínuo através de um fluido carregador, de modo que ocorra dispersão reprodutível, poderá culminar na conversão satisfatória entre os reagentes e o fluido carregador, o qual, ao passar pela zona de detecção, proporcione a medida requerida do sinal analítico. Dessa forma, o perfil de concentração resultante registrado via sinal do detector, dependerá do grau de dispersão dos componentes da solução. Sistemas de análise em fluxo são considerados por alguns pesquisadores como uma revolução na prática da química (Hohne, Pierce, 1989).

Li e colaboradores (2000a), propuseram um método automático de análise por injeção em fluxo (FIA) “*stopped-flow*” (com possibilidade de interrupção de fluxo), capaz de promover o monitoramento simultâneo de dissolução de multicomponentes em preparações sólidas, incluindo a RF. A técnica utilizada é a espectrometria de fluorescência síncrona, com sensor de fibra ótica e métodos quimiométricos, de modo a se solucionar as dificuldades advindas de possíveis sobreposições espectrais dos analitos, e de interferentes advindos das substâncias excipientes. O diagrama esquemático do dispositivo FIA com sensor de fibra ótica é apresentado na Figura 20, no qual, a luz da fonte de luz (FL) é guiada através do feixe de fibras bifurcadas (FFB), que podem emitir fluorescência na célula de fluxo contínuo (CFC). O fluido transportador é impulsionado pela bomba peristáltica (BP), a amostra (A) é injetada no fluido transportador pela válvula (V) e a informação quantitativa do analito é medida no sensor de fibra ótica (SFO), a fluorescência é guiada de volta para o tubo fotomultiplicador (TFM), e convertida em um sinal elétrico, amplificado e registrado. A mistura segue então para descarte, podendo-se então, iniciar uma nova análise.

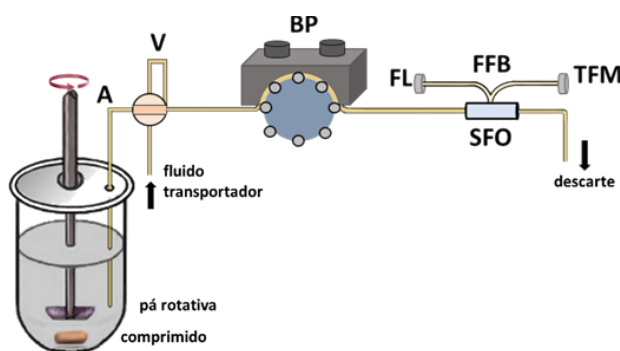


Figura 20 - Diagrama esquemático do dispositivo FIA com destaques para sensor de fibra ótica, fonte de luz (FL) feixe de fibras bifurcadas (FFB) célula de fluxo contínuo (CFC), tubo fotomultiplicador (TFM), bomba peristáltica (BP); tubo por onde a amostra (A) é injetada no fluido transportador, válvula (V) e o sensor de fibra ótica (SFO), adaptado de Li et al., (2000a).

A pá rotativa (Figura 20) é mantida a 50 rpm e o volume da câmara de dissolução é de 250 mL, o líquido é mantido termostatizado. O sistema de injeção “*stopped flow*” foi desenvolvido para se estabelecer o tempo ótimo de dissolução dos comprimidos em função de sua concentração máxima. Para a RF, para os níveis de concentração simuladas de 3,0; 4,5; e 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi encontrada uma faixa de recuperação de 97,8 a 103,3 %.

O autor destaca ainda que o sistema FIA de monitoramento, pode ser considerado como uma nova técnica eficaz para o monitoramento simultâneo de processos envolvendo drogas terapêuticas e seus metabólitos.

2.10.3 Sistemas automáticos fluxo-batelada

Em geral, o sistema automático fluxo-batelada (FBA), proporciona melhor desempenho analítico no que diz respeito a sua capacidade de preparo de soluções, calibração in line, menor quantidade de resíduos gerados, rapidez na amostragem, e menores limites de detecção, se comparado com outros sistemas em geral. Isso se deve em grande parte, à configuração do mesmo, caracterizada como um híbrido entre sistemas em batelada e em fluxo, e dessa forma, assimilando as vantagens, de ambos os sistemas. Uma das razões dessa versatiliade, é a sua câmara de mistura, que dispensa a necessidade de fluido carregador, como ocorre nos analisadores em fluxo mais comuns (Diniz et al., 2012).

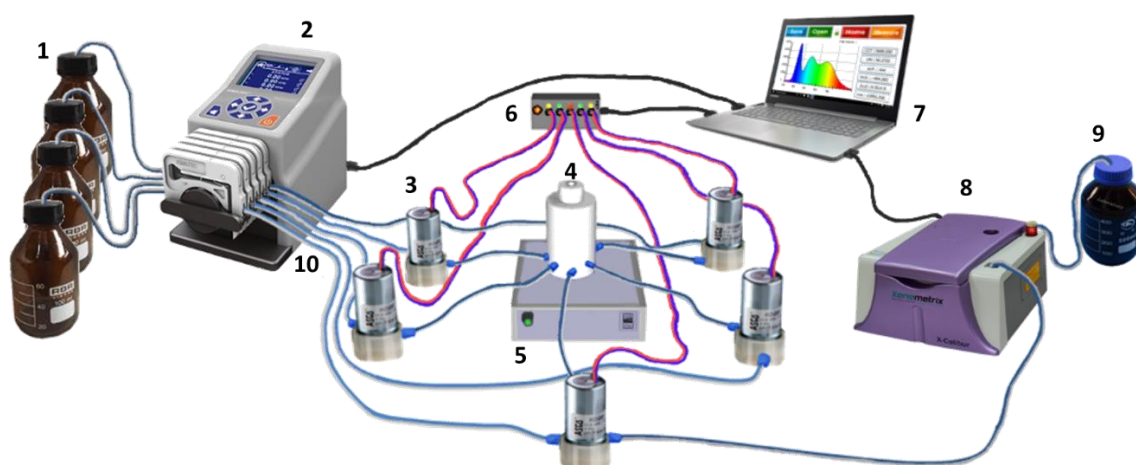


Figura 21 - Esquema ilustrativo de uma montagem típica do FBA. (1) recipientes para soluções estoque (2) sistema de propulsão por bomba peristáltica, (3) válvulas solenoides, (4) câmara de mistura ou reação, (5) agitador magnético, (6) acionador de válvulas, (7) computador, (8) sistema de detecção, (9) recipiente para descarte, (10) tubos flexíveis, adaptado de Diniz et al., (2012).

Como pode ser visto no esquema representado pela Figura 21, basicamente, o sistema FBA é constituído pela combinação de acessórios interligados e controlados em ambiente computacional (Figura 21.7) garantindo a facilidade de operação, maior precisão de resultados, maior reprodutibilidade, consequentemente, aumento da velocidade analítica. As soluções de reagentes e solventes a serem utilizadas, são succionadas a partir de recipientes estoque (Figura 21.1).

A câmara de mistura ou câmara reacional, pode ser considerada como um dos componentes característicos do sistema FBA (Figura 21.4), e Consiste em uma peça confeccionada (usinada) em Teflon®, acrílico ou um polímero como o uretano-acrilato (Monte-Filho, et al., 2011), cujo volume pode variar entre 0,2 a 2,0 mL, para onde convergem as

soluções envolvidas no método utilizado, e de onde a mistura pode ser retirada para mais uma etapa, ou conduzida ao descarte.

No FBA, o Sistema de detecção (Figura 21.8) irá depender do método analítico, e poderá ser acoplado à própria câmara de mistura. O impulsionamento e transporte dos fluidos para a câmara de mistura ou de reação (Figura 21.4), para o sistema de detecção (Figura 21.8) e descarte (Figura 21.9), podem se dar por meio de uma bomba peristáltica (Figura 21.2), através de vários canais (tubos flexíveis), de maneira simultânea (Figura 21.10) mantendo a vazão praticamente constante. Outros aparatos de propulsão podem ser utilizados para a mesma finalidade, como microbombas de diafragma ou pistão, e bombas seringas.

A comunicação entre o computador e os componentes do sistema como as válvulas solenóides, bomba, detector, geralmente é feita com o auxílio de um acionador de válvulas (Figura 21.6). As válvulas solenóides (Figura 21.3) são utilizadas para o direcionamento e o controle de adição de volumes predefinidos e precisos de fluidos. A depender da configuração do sistema, tais operações podem ser realizadas por outros aparatos como, válvulas pinça, válvulas SIA (do inglês, *Sequential Injection Analysis*), e microbombas.

Os acionadores de válvulas solenoides (Figura 21.6) são constituídos por circuitos integrados, e respondem pelo acionamento (abrir/fechar) das mesmas de maneira simultânea ou independente. A disposição da câmara de mistura ou reação, pode se dar sobre um agitador magnético (Figura 21.5) que por sua vez, promove a rotação de uma pequena barra magnética introduzida no interior da câmara, e com isso ocorre a agitação adequada dos fluidos. A agitação pode ser realizada também por uma pequena haste acoplada a um motor, posicionados acima da câmara de mistura, caso não seja possível se utilizar agitação com a barra magnética (Monte-Filho et al., 2011).

A configuração versátil do FBA permite que a maioria dos procedimentos de análise sejam realizados na própria câmara, como por exemplo, a adição de padrões, preparo de soluções, homogeneização, calibração de soluções, pré-tratamentos, reações, retenção de líquidos reacionais e detecção analítica. A princípio, a idealização do sistema FBA, se mostrou adequada para a aplicação em um algoritmo envolvendo a sequência numérica de Fibonacci, aplicada na adição de reagentes em titulações, de maneira que a operação seja otimizada ao menor número de adições possíveis (Honorato et al., 1999). Entretanto, o próprio conceito do FBA, consolidado por meio de seus componentes, os quais trazem inúmeras possibilidades de reconfiguração, resultam na aplicação desse sistema em muitos outros trabalhos de automação com fins analíticos até os dias de hoje (Diniz et al., 2012).

A combinação das características dos componentes descritos acima, torna o FBA um híbrido de sucesso entre os sistemas em fluxo e em batelada, aumentando as possibilidades de exploração de suas características no desenvolvimento de métodos automáticos de análises. Pela sua configuração dispensar a utilização do fluido carregador, além de possibilitar a realização de análises tanto em fluxo, quanto em batelada, comportar opções de volumes mínimos em sua câmara reacional, promovendo assim análises com baixo consumo de soluções, consequentemente, reduzindo a geração de resíduos, montagem de seus aparatos envolver geralmente materiais de baixo custo, trazendo consequentemente facilidade de automação, apresentar elevada precisão e velocidade analítica, e baixo grau de manipulação de reagentes, o FBA se consolida em termos de robustez, e versatilidade (Diniz et al., 2012).

Alguns exemplos de aplicação do FBA são ilustrados a seguir, em determinações de analitos em matrizes complexas como produtos farmacêuticos e bebidas.

Honorato e colaboradores (1999) propuseram uma nova abordagem de titulação espectrofotométrica automática, onde o ponto final é encontrado por meio do método de Fibonacci, adaptado para um algoritmo unidimensional de otimização para titulações rápidas. O método foi utilizado para vinhos brancos com indicador *m*-cresol e NaOH. O detector foi ajustado para comprimento de onda de 578 nm. O sistema alcançou uma frequência analítica de 20 amostras por hora, a faixa de concentração utilizada foi de 25,0 a 55,0 mmol L⁻¹ para vinhos, e o tempo de titulação foi de dois minutos e meio aproximadamente.

Grünhut e colaboradores (2011) desenvolveram um FBA dedicado a detecção de catecolaminas em preparações farmacêuticas, baseado no efeito inibidor de quimiluminescência dessas substâncias em luminol, tratado com hexacianoferrato de potássio em meio básico. Em presença das catecolaminas dopamina, norepinefrina, ou epinefrina, a intensidade de emissão do luminol, decresce em proporção com sua concentração, alcançando linearidade analítica no intervalo de 8,0 a 18,8; 4,5 a 10,6 e 14,7 a 34,3 ng mL⁻¹ para dopamina, norepinefrina e epinefrina, respectivamente, e limites de detecção de 1,1 a 3,3 ng mL⁻¹. O método automático proposto alcançou uma frequência analítica de 28 amostras por hora, se mostrando aplicável em análises rotineiras de controle de qualidade industrial.

Nascimento e colaboradores (2011), desenvolveram um sistema analisador FBA automático baseado em detecção espectrofotométrica UV-Vis na faixa de comprimento de onda de 235 a 355 nm, para análise de adulteração a níveis de 5 e 10%, com água, metanol e etanol em bebidas destiladas (uísque, cachaça, conhaque, rum e vodca), aplicando para tanto, a técnica de modelagem estatística de classificação SIMCA (do inglês, *Soft Independent Modelling of Class Analogies*) com o intuito de discriminar amostras puras daquelas que sofreram

adulterações, não encontrando falsos positivos ou negativos, de modo que as adulterações foram corretamente detectadas nas análises.

Em 2014, Lima e colaboradores, fizeram uso de nanopartículas fluorescentes baseadas em Telureto de Cádmio, para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas. A estratégia de detecção se deu a partir do efeito de inibição da fluorescência das nanopartículas, causada pelo ácido ascórbico. O limite de detecção para o método, foi estimado em $3 \mu\text{g L}^{-1}$, e a faixa linear de trabalho, de 10 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. A frequência analítica foi de 69 amostras por hora, podendo dessa forma, contribuir em aplicações analíticas no controle de qualidade de indústrias de sucos de frutas, um segmento que se encontra em um patamar elevado de produção no Brasil.

A combinação de um sistema automático FBA acoplado a uma webcam, foi utilizada para determinação espectrofluorimétrica de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas por Lima e colaboradores (2014). O reagente utilizado foi o nanomaterial telureto de cádmio, e a técnica se baseou nas interações superficiais destes com o analito, resultando em um aumento da fluorescência das nanopartículas, proporcional à concentração da N-acetil-L-cisteína na solução. O sistema atingiu um limite de detecção de $0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$, e uma frequência analítica de 153 amostras por hora, apresentando uma linearidade na faixa de 5,0 a $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Um sistema automático FBA miniaturizado e de baixo custo, descrito como μFBA (micro-flow-batch) foi desenvolvido por Monte-Filho e colaboradores (2011), a partir da resina fotocurável de poliuretano-acrilato, e utilizada na determinação espectrofotométrica do ferro (II) em suplementos vitamínicos, segundo o método da 1,10-fenantrolina. A agitação na câmara de mistura, se deu através de uma haste de nylon horizontalmente e externamente acoplada a um pequeno motor. A frequência analítica alcançada pelo sistema foi de 120 amostras por hora. O método apresentou linearidade na faixa de calibração de 1,0 a $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe(II), o sistema de detecção incrustado na microcâmara, consistiu em um LED com emissão máxima de 522 nm como fonte de radiação, e um fototransistor como detector. As operações envolvidas no processo automático foram realizadas através de comandos controlados por software, via interface do tipo USB, e modulo de acionamento de válvulas, controladas via software LabVIEW®.

3

EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Na realização deste trabalho utilizou-se água previamente destilada e deionizada, apresentando resistividade maior que 18,2 MΩ cm a 25 °C (sistema de deionização Milli-Q *Millipore Corporation*). Foram utilizados apenas reagentes de grau analítico.

Para a síntese dos NSPCs, a cebola e o limão foram comprados no mercado local da cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil, e o hidróxido de amônio, adquirido da empresa Sigma-Aldrich, Brasil. Para ambos os métodos propostos, a determinação dos analitos envolveu NSPCs diluídos de modo que sua concentração final se manteve em 98,6 mg L⁻¹. O sulfato de quinino foi adquirido da empresa Acros (USA), e utilizado como padrão para medida do RQF.

Preparou-se uma solução estoque de 100,0 mg L⁻¹ de RF (Mack, Grill, 2006) através da dissolução do sólido padrão (Sigma-Aldrich, Brasil) em água deionizada, mantendo-se o mesmo a baixa temperatura (cerca de 4 °C) e ao abrigo da luz. A partir do estoque, foram preparados padrões para serem utilizados tanto no método de referência, quanto no método proposto (1,0 a 3,0 × 10³ ng mL⁻¹).

A solução tampão fosfato foi preparada a partir da mistura de soluções equimolares (0,10 mol L⁻¹) de dihidrogeno fosfato de potássio e hidróxido de sódio (Synth, Brasil), até o estabelecimento do equilíbrio no pH 6,9.

Para a determinação da RF em multivitamínicos, uma avaliação dos potenciais interferentes: ácido fólico, ácido cítrico, ácido L-ascórbico, ácido pantotênico, cianocobalamina, biotina, niacina, tiamina, sacarose, D-glucose, frutose, e nitratos de Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, K⁺ (Sigma-Aldrich), foram dispersos na proporção de 100:1 com a RF e mantidos a pH 6,9.

Para o método de referência para RF em suplementos multivitamínicos, foi utilizado metanol (Sigma-Aldrich), solução de formiato de amônio de 10 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich), com o pH ajustado para 3,8 com ácido fórmico (Sigma-Aldrich), para a composição das fases móveis.

Para a determinação da RF pelo método de referência em bebidas, a concentração do tampão fosfato utilizado foi de 0,05 mol L⁻¹ levado a pH 3,0 com ácido fosfórico (Sigma-Aldrich). A solução para diluição dos padrões de RF (100,00 mL), foi feita a partir de 80,00 mL do tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ misturado com 20,00 mL de Acetonitrila (Sigma-Aldrich). As amostras de bebidas foram diluídas com a mesma solução.

Para a determinação do nitrogênio total nos NSPCs foi utilizado ácido sulfúrico concentrado (Alphatec), ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (Dinâmica), hidróxido de sódio a 40 % (m

v⁻¹) (Dinâmica), ácido bórico a 4 % (m v⁻¹), (Alphatec), verde de bromocresol a 0,1 % (m v⁻¹) (Alphatec), solução alcoólica de fenolftaleína a 1,0 % (m v⁻¹) (Dinâmica), e uma mistura catalítica: 1,0 g de sulfato de cobre (Dinâmica), 0,1 g de dióxido de selênio (Dinâmica), 10 g de sulfato de sódio (Alphatec).

3.2 Bioprecursores

Foram utilizados suco de limão (*citrus limonum*), extrato de cebola (*allium cepa*) e o hidróxido de amônio 25% (v v⁻¹) para a produção dos NSPCs.

3.3 Amostras de suplementos vitamínicos e minerais

O método proposto foi usado para determinação de RF, primeiramente em suplementos multivitamínicos e minerais sólidos, a partir do preparo e diluição de soluções de maneira convencional, e seus resultados comparados com o método de referência. Para tanto, foram adquiridas no mercado local de João Pessoa, Paraíba, Brasil, nove amostras comercialmente disponíveis e dentro do prazo de validade, de três tipos de diferentes suplementos multivitamínicos e minerais, pertencentes a lotes distintos, sendo três amostras de cada tipo.

As amostras foram preparadas para análise de acordo com o seguinte procedimento: cinco comprimidos de cada amostra foram pulverizados cuidadosamente com o auxílio de almofariz e pistilo, e transferidos para um béquer, juntando-se 50 mL de água deionizada, em seguida, submeteu-se essa mistura à sonicação, por 15 min, e agitou-se por 30 minutos. A mistura então foi filtrada, lavando-se a fração insolúvel com água deionizada, até o volume de 250,00 mL medido em balão volumétrico (Brezo et al., 2015; Sim, Kim, Lee, 2016). As amostras foram refrigeradas e guardadas ao abrigo da luz, para serem utilizadas no mesmo dia.

Para o método de referência HPLC, a solução tampão utilizada na análise foi o formiato de amônio (10 mmol L⁻¹) ajustado a pH 3,8 com ácido fórmico.

A composição nutricional das amostras de suplementos vitamínicos e minerais contida nos seus respectivos rótulos, está descrita na tabela 3.

Tabela 3 - Composição nutricional dos comprimidos vitamínicos e minerais utilizados como amostras.

Composição dos comprimidos multivitamínicos e minerais				
Componente	produto 1	produto 2	produto 3	unidade
Vitamina A	600	400,0	400,0	*mcg
Vitamina D	5,0	5,0	5,0	*mcg
Vitamina C	45,0	45,0	45,0	mg
Vitamina E	10,0	6,7	6,7	mg
Tiamina	1,2	1,2	1,0	mg
Riboflavina	1,3	1,3	1,0	mg
Nicotinamida	14,0	16,0	14,0	mg
Vitamina B6	1,3	1,3	1,3	mg
Ácido fólico	240,0	240,0	240	*mcg
Vitamina B12	2,4	2,4	2,4	*mcg
Biotina	30,0	30,0	30,0	*mcg
Ácido pantotênico	5,0	5,0	5,0	mg
Vitamina K	—	65,0	25,0	*mcg
Cálcio	—	250,0	320,0	mg
Ferro	12,0	8,1	10,0	mg
Magnésio	30,0	100,0	1,8	mg
Zinco	6,0	7,0	7,0	mg
Iodo	—	33,0	33,0	*mcg
Cobre	800,0	450,0	450,0	*mcg
Selênio	—	20,0	20,0	*mcg
Molibdênio	—	23,0	23,0	*mcg
Cromo	—	18,0	25,0	*mcg
Manganês	—	1,2	1,8	mg

*mcg = microgramas

3.4 Amostras de cervejas e vinhos

Após os resultados obtidos na aplicação do método convencional em multivitamínicos e minerais considerou-se a necessidade de quantificação da RF em vinhos e cervejas, devido a sua relação com a qualidade desses produtos. A automação através do FBA é uma alternativa eficaz para se minimizar a fotodegradação devida à exposição dos padrões e amostras à luz ambiente, e para facilitar a adição de padrões e diluição de soluções, entre outras.

Quatro amostras de cervejas do tipo pilsen e quatro amostras de vinhos brancos, de marcas distintas, adquiridas em mercado local e dentro do prazo de validade, foram mantidas sob refrigeração e ao abrigo da luz, sendo abertas apenas no momento da análise, após isto, mantidas em atmosfera inerte via expurgo com nitrogênio ultrapuro.

Para o método de referência HPLC, preparou-se previamente o tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ com acetonitrila, na proporção 80:20 (v v⁻¹).

A diluição das amostras foi realizada com a solução tampão fosfato/acetonitrila na proporção 1:1 (v v⁻¹), (Andrés-Lacueva, Mattivi e Tonon,1998).

Para o método automático (FBA), as amostras foram previamente filtradas em filtro seringa para cromatografia (0,45 µm), e também diluídas na proporção 1:1 (v v⁻¹), preenchendo metade da câmara de mistura (0,90 mL).

Os teores alcoólicos das bebidas utilizadas como amostras para o método proposto, descritos em seus rótulos encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Teor alcoólico das cervejas utilizadas no presente trabalho (informação dos rótulos).

Amostra	Teor alcoólico % (v v ⁻¹)
Cervejas	1 4,8
	2 4,5
	3 4,7
	4 4,9
Vinhos	5 10,5
	6 11,0
	7 11,5
	8 12,0

3.5 Aparatos

Para separar o material particulado, utilizou-se uma centrífuga compacta da marca Hermle, modelo Z206A, com velocidade máxima de rotação de 6000 rpm (LAQA).

Uma balança analítica *Scientech* modelo AS210, foi utilizada nas medições das massas envolvidas no trabalho (LAQA).

Para registro dos espectros de absorção molecular foi empregado um espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard (HP), modelo 8453, equipado com uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico (LAQA).

Um espectrofluorímetro Cary Eclipse modelo G9800A, e uma cubeta quartzo de 10 mm de caminho óptico foram empregados para obtenção dos espectros de emissão e de excitação dos NSPCs para a caracterização dos mesmos, em termos de fluorescência intrínseca, e para realização das medidas, de determinação de RF em suplementos vitamínicos (LEQA).

Para registro das medidas dos espectros de fluorescência no sistema automático FBA proposto, foi empregado um espectrofluorímetro portátil Ocean Optics®, modelo USB4000 tendo como fonte de emissão de radiação um LED ultravioleta, com emissão máxima em 380 nm.

Uma bomba peristáltica Ismatec®, (modelo MCP Standard) equipada com 8 canais, ligada a cinco válvulas solenoides *three-way* da Cole Parmer® (modelo EW-01540-13) e com tubos de Viton®, Teflon® e Tygon® foram empregadas para propulsão e direcionamento dos fluidos na câmara de mistura do FBA.

Para o controle do acionamento (abertura/fechamento) das válvulas solenoides e do agitador magnético (AM), foi utilizado um acionador de válvulas (Lab made), com possibilidade de controle de até oito portas de saída. O acionador é baseado em um circuito integrado ULN2803, fabricado pela Toshiba, o qual consiste em um arranjo de oito transistores do tipo Darlington, apropriados para suportar alta tensão e corrente. O acionador possui comunicação com as válvulas solenoides e o AM através da interface USB-6009 (National Instruments®).

Para caracterização e análise elementar dos NSPCs, foi utilizado um espectrômetro sequencial de fluorescência de raios X por dispersão em comprimento de onda, modelo WDXRF 1800 Shimadzu (LSR-CT).

Para caracterização morfológica do material sintetizado, foi utilizado um espectrômetro de difração de raios X, modelo XRD 6000, Shimadzu (LACOM).

Para investigação dos grupos funcionais presentes nos NSPCs, foram registrados espectros de FTIR empregando um espectrofotômetro Shimadzu, modelo IRPrestige-21 (LACOM).

Para visualização, classificação morfológica, distribuição de tamanhos e da organização espacial dos NSPCs, foi utilizado um microscópio TEM, de marca JEOL (Japão) e Modelo JEM2100 LaB6, operando a 200 kV, (Laboratório de Microscopia Eletrônica-LME-Instituto de Química de São Carlos-IQSC). Para o preparo das amostras, gotejou-se uma solução aquosa de 100 mg L⁻¹ de NSPCs em um grid de cobre recoberto com carbono (300 mesh), secando-se o solvente à temperatura ambiente.

A estimativa da distribuição dos tamanhos das partículas, foi realizada com o auxílio do programa ImageJ®.

A síntese dos NSPCs foi realizada em um forno de microondas caseiro BRASTEMP active!, modelo BMS45BBBNA, 1450 W, 2460 MHz.

A sonicação das amostras foi realizada por um banho ultrassônico, (UNIQUE, 40 Hz, 132W, Modelo USC-1800A), (LAQA).

A agitação das amostras se deu através de um agitador VORTEX-2-GENIE (Scientific Industries), (LAQA).

A secagem do material fluorescente foi realizada em estufa microprocessada Sterilifer (LAQA).

As medidas de pH das soluções foram realizadas através do pHmetro Metrohm 713 (LAQA).

A análise de nitrogênio total foi realizada com um digestor TECNAL (TE-008/25), e com um destilador de Kjeldahl TECNAL (TE-0364), (LTA – CT).

3.6 Síntese, purificação, otimização e caracterização dos NSPCs

Os NSPCs de alta fluorescência foram sintetizados em etapa única, ou seja, sem posterior funcionalização. Após obtenção dos sucos de limão e cebola via extração por simples esmagamento e posterior filtração em filtro de nylon comercial para café, foram misturados 20,0 mL de suco de limão e 2,0 mL de suco de cebola, com 8,0 mL de água deionizada e 10,0 mL de uma solução de hidróxido de amônio a 25% (v v⁻¹). A mistura foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL, aquecida em um forno de micro-ondas doméstico de potência 1450 W durante 6 min, resultando em um material sólido de cor castanho-escuro.

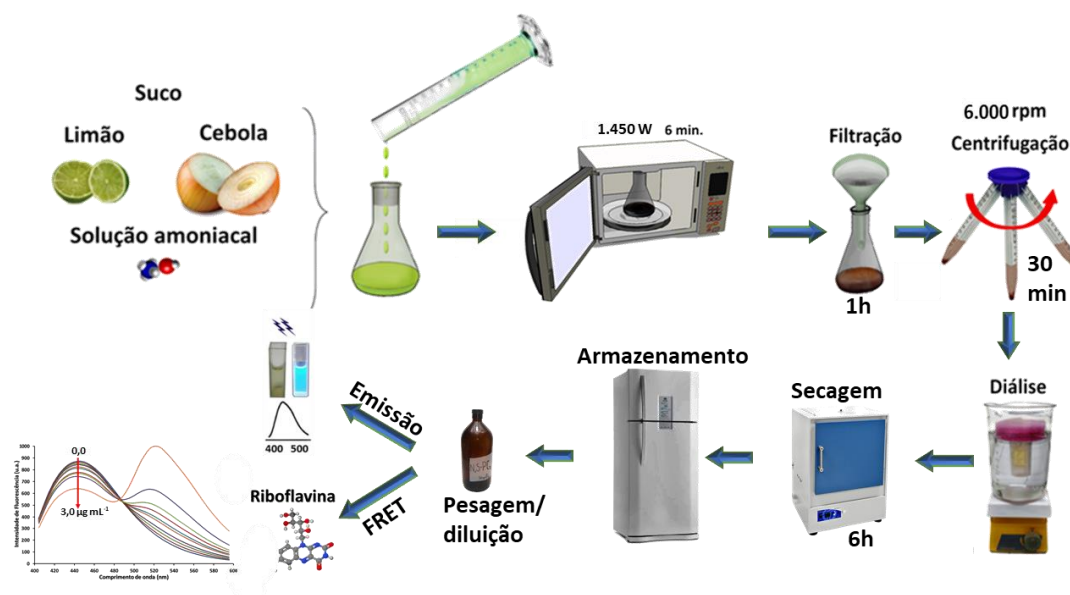


Figura 22 - Diagrama esquemático da síntese em etapa única via microondas dos NSPCs a partir de biomassa de limão e cebola em meio amoniacal, seguido de filtração (cerca de 1h) e centrifugação por 30 minutos, diálise por 24 horas (1 kDa), secagem por 6h a 40°C e diluição. Excitado em 380 nm, e fluorescência decrescente com o aumento de concentração da RF.

Após levado à temperatura ambiente e dissolvido em água deionizada, as partículas insolúveis foram removidas através de filtração à pressão atmosférica com papel de filtro quantitativo, por cerca de 1 hora e posteriormente por centrifugação a 6000 rpm, durante 30 minutos. A solução resultante foi dialisada contra água deionizada através de tubo de diálise (MWCO, 1 kDa) durante 24 horas para remoção de material não fluorescente. O procedimento de síntese foi esquematizado conforme indicado na Figura 22. Para se estabelecer e ajustar a concentração dos NSPCs, a solução obtida foi submetida à evaporação em estufa à 60° C por cerca de 6 horas, resultando em um material sólido, que em seguida, foi pesado e novamente disperso em água deionizada a uma concentração de 657,3 mg L⁻¹, e então armazenado a 4° C para utilização posterior.

3.6.1 Cálculo do rendimento quântico de fluorescência

Feita a verificação qualitativa da fluorescência dos NSPCs por luz negra, determinou-se o seu RQF pelo método comparativo utilizando como padrão o sulfato de quinino (equação 1). Foi então preparada uma solução com absorbâncias abaixo de 0,05 u.a. para cada substância envolvida. A partir das mesmas, diluições na faixa de 5 a 30% foram preparadas e utilizadas na determinação (Williams, Winfield, 1983; Tian et al., 2017; Brouwer, 2011). Relacionou-se as absorbâncias com as áreas sob as bandas de fluorescências das soluções, aplicou-se a equação da reta para cada espécie, substituindo-se os valores do RQF do sulfato de quinino e os

respectivos gradientes das equações, considerando-se ainda, que os valores dos índices de refração entre as duas soluções (devido à diluição), por não apresentarem diferenças significativas, podem se anular, encontrou-se o RQF_{NSPCS} .

3.6.2 Caracterização elementar

Procedeu-se a análise elementar dos NSPCS por WD-XRF, exceto do nitrogênio total, que foi determinado no laboratório de tecnologia de alimentos (CT) pelo método Kjeldahl (Thiex et al., 2002; IAL, 2008). Mediu-se a massa da amostra, transferindo-a para o tubo de digestão, em seguida, adicionou-se 0,5 g de mistura catalítica, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e levou-se à digestão. Após esfriamento, acopla-se o tubo ao destilador após adicionar indicador fenolftaleína. Um erlenmeyer com 20,0 mL de ácido bórico a 4 % ($m\ v^{-1}$) e algumas gotas do indicador misto de vermelho de metila e verde de bromocresol é levado ao destilador, devendo-se mergulhar a saída do condensador ao Erlenmeyer. Adiciona-se NaOH 40% ($m\ v^{-1}$) ao tubo até conseguir pH alcalino (observe a fenolftaleína mudar de cor) e procede-se a destilação até obtenção de 3 vezes o volume inicial. O destilado do Erlenmeyer deve apresentar uma coloração verde.

Procede-se a titulação da solução contida no erlenmeyer com HCl 0,1 $mol\ L^{-1}$ até aparecimento da coloração rósea. Procede-se a titulação do branco analítico e subtrai-se o seu valor do resultado da amostra. O teor de nitrogênio total foi calculado segundo o manual do laboratório citado, através da equação 6:

$$Nitrogênio\ total\ \% (m\ m^{-1}) = ((VA - VB) \times 0,1 \times fa \times 0,14) / P \quad (Equação\ 6)$$

Onde 0,1 é a concentração do ácido clorídrico, VA corresponde ao volume de ácido clorídrico utilizado na amostra, VB corresponde ao volume de ácido clorídrico utilizado no branco analítico, fa é o fator de correção do ácido clorídrico, P é a massa da amostra.

3.6.3 Influência do tempo de irradiação com micro-ondas

Com a relação volumétrica dos constituintes da síntese já estabelecida de 20,0 mL de suco de limão e 2,0 mL de suco de cebola, com 8,0 mL de água deionizada e 10,0 mL de uma solução de hidróxido de amônio a 25% ($v\ v^{-1}$), investigou-se a influência do tempo de irradiação

com micro-ondas, mantendo a mesma potência nominal e o volume de solução de hidróxido de amônio. Encontrando-se o tempo de 6 min como o mais adequado para a síntese dos NSPCs.

Alguns métodos de síntese de PCs requerem horas outros, minutos, e por isso são classificados como lentos ou rápidos, porém, a purificação através da diálise é uma etapa essencialmente lenta, o processo como um todo, fica condicionado à mesma. Dessa forma, neste trabalho, esta etapa não foi considerada na classificação.

3.7 Determinação fluorimétrica de RF utilizando NSPCs

Após o estabelecimento dos parâmetros de síntese considerados mais adequados para obtenção de nanopartículas funcionalizadas com S e N, testou-se primeiramente o método para determinação de RF em fármacos, aplicando-o em amostras de suplementos vitamínicos e minerais de maneira convencional, isto é, manualmente, constatou-se então a ocorrência do fenômeno FRET entre os NSPCS e a RF conforme descrito na literatura (Wang et al., 2015a; Kundu et al., 2013), procedendo-se então a determinação e a respectiva validação do método.

Em seguida, testou-se a automação do método para determinação de RF em cervejas e vinhos utilizando-se um sistema FBA.

A capacidade de detecção e quantificação da RF pelos NSPCs foi avaliada usando equação da eficiência de FRET (EFRET%):

$$EFRET\% = \left(\frac{F_0 - F}{F_0} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde F e F₀ representam a intensidade de fluorescência a 440 nm dos NSPCs na presença e ausência da RF, respectivamente (Sun et al., 2013). Para qualquer que seja o comprimento de onda de excitação estudado, observa-se um aumento gradual da EFRET% nos NSPCs com a adição de RF (Figura 35C) semelhante a outros estudos na literatura (Wang et al., 2015a; Kundu et al., 2016). Portanto, NSPCs sintetizados a partir de sucos de limão e cebola podem ser usados com sucesso na determinação de RF.

3.7.1 Procedimento de análise pelo método convencional

Para o ensaio típico aplicado às amostras de suplementos multivitamínicos, foi necessária a dissolução da vitamina contida na amostra, seguida de filtração e diluição adequada, como descrito anteriormente. Para cada medida, foram adicionados via micropipeta, 300 μL de dispersão de NSPCs e 250 μL de solução tampão fosfato pH 6,9. Em seguida, adicionou-se soluções padrão de riboflavina ou amostra, completando-se o volume no tubo para 2,0 mL com água deionizada. A concentração de NSPCs na mistura, foi mantida a 98,6 mg L^{-1} e os níveis de concentração de RF utilizados para a confecção da curva analítica foram: 0,10; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As concentrações de RF nas amostras, e o percentual de recuperação, foram determinadas a partir da curva analítica, de modo que, para cada medida, adicionou-se 100 μL de solução da amostra, e após completar-se o volume total de 2,00 mL, com os outros participantes da análise, procedeu-se a incubação ao abrigo da luz durante 1 minuto à temperatura ambiente, em seguida registrou-se em triplicata, a intensidade de fluorescência através do fluorímetro Cary Eclipse, aplicando-se um comprimento de onda máximo de excitação de 380 nm. Para a determinação da concentração de RF nas amostras, foi utilizado um volume de 100 μL de solução de cada amostra, para que a concentração teórica final permanecesse em torno de 1,0 mg L^{-1} .

3.7.2 Desenvolvimento do sistema fluxo-batelada

3.7.2.1 Montagem do sistema FBA

Na montagem do sistema, foram utilizados os equipamentos e materiais conforme a figura 23 onde é mostrada uma foto do sistema automático FBA montado, utilizado no trabalho proposto, com as indicações dos seus componentes, comentados nos tópicos seguintes, como o espectrofluorímetro portátil (b), o LED com o dissipador de calor (c), acoplados à (CM) (a), confeccionada em politetrafluoretileno, comercialmente conhecido como Teflon[®], cujo volume interno é de aproximadamente 1,8 mL, quatro canais de entrada e um de saída para líquidos, uma barra magnética de 5 mm introduzida no interior da câmara, para promover a dispersão das nanopartículas, e a homogeneização dos fluidos.

Para que não houvesse influencia na repetibilidade ou na reprodutibilidade dos resultados, a agitação se deu via alta rotação da barra magnética revestida de Teflon[®] inserida na CM, proporcionada por um AM (d).

Uma bomba peristáltica (g), aliada a cinco válvulas solenoides (e) acopladas a tubos de transporte de fluidos.

O acionador de válvulas (h), utilizado para controlar o AM (d), e a abertura e o fechamento das válvulas solenoides (e). O AM e as válvulas solenoides requerem tensão de alimentação de 12 V, e seu acionamento é feito ao receber tensão superior a 3,8 V em uma das portas de entrada, gerando dessa forma, uma corrente de 150 mA em cada porta de saída, onde estão conectadas as válvulas e o AM.

Um terminal de computador pessoal possibilita o comando de acionamento, via interface (h), conectada às portas de entrada do do acionador de válvulas e ao computador, através de uma porta USB.

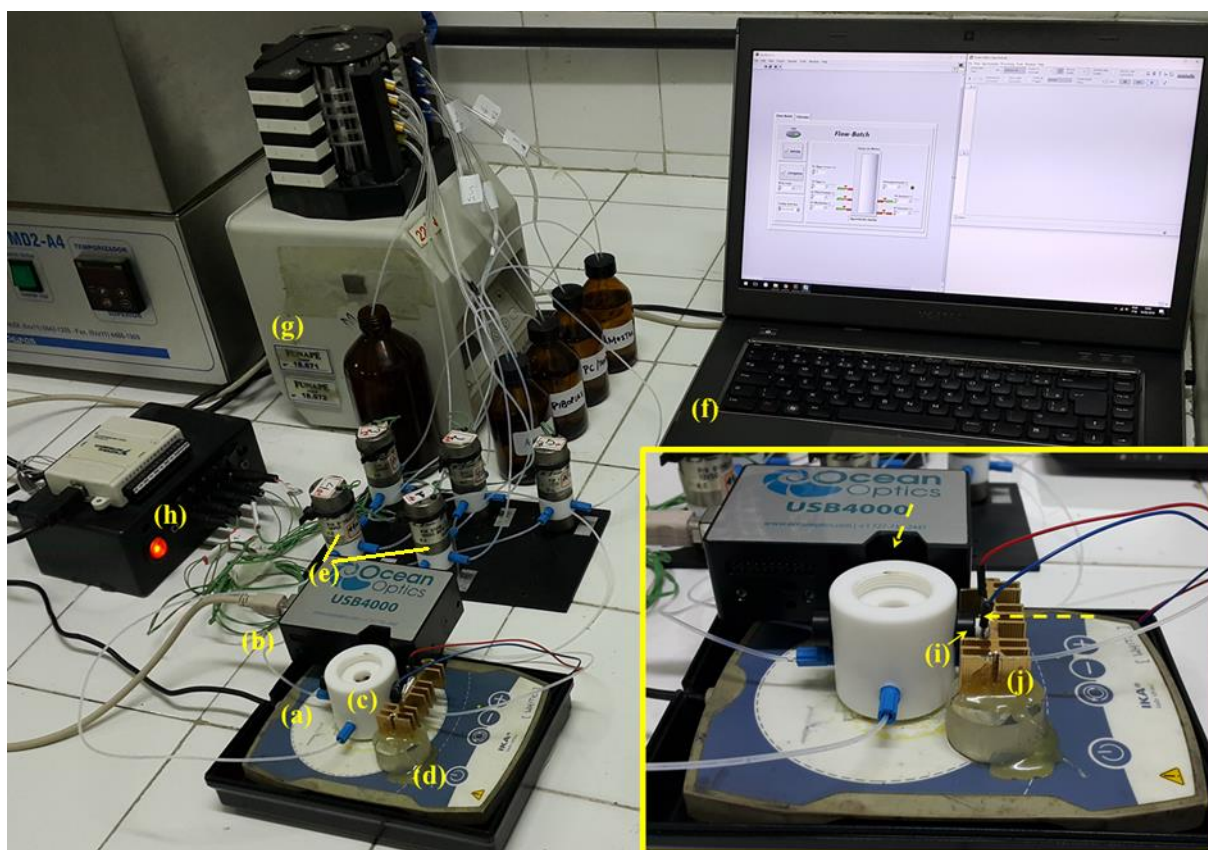


Figura 23 - Imagem do sistema automático FBA utilizado. (a) câmara de mistura, (b) espectrofluorímetro portátil, (c) LED ultravioleta acoplado ao FBA, (d) agitador magnético portátil, (e) válvulas solenoides, (f) computador, (g) bomba peristáltica, (h) acionador e interface. No destaque, as setas tracejadas indicam o ângulo de 90° entre o LED e o detector de fluorescência, (i) LED ultravioleta, (j) dissipador de calor.

A CM e os componentes de detecção acoplados podem ser vistos no detalhe da figura 23, os quais consistem em um espectrofluorímetro portátil, posicionado em frente a uma das janelas

da câmara de mistura, conforme as setas tracejadas, perfazendo um ângulo de 90° com a janela de localização do LED (i), acoplado a um dissipador de calor (j).

Buscando minimizar a interferência de fontes externas de luz, durante as medidas, o LED ultravioleta (emissão máxima em 380nm), a câmara de mistura, e o espectrofluorímetro portátil, foram protegidos de fontes externas de luz por uma caixa plástica de cor preta e dimensões 10×12×15 cm.

3.7.3 Procedimento automático de análise

As vazões médias encontradas para os canais individuais das soluções empregadas durante a determinação de riboflavina em cervejas e vinhos são apresentadas na seção 4.3.1.

O diagrama esquemático do sistema proposto, empregado para realizar de maneira automática, as etapas analíticas que constituem o método de determinação da RF em vinhos e cervejas, incluindo as medidas de fluorescência está mostrado na figura 24. O arranjo físico do sistema fluxo-batelada (FBA) permaneceu inalterado durante todos os procedimentos analíticos empregados na determinação de RF nas amostras de vinhos e cervejas.

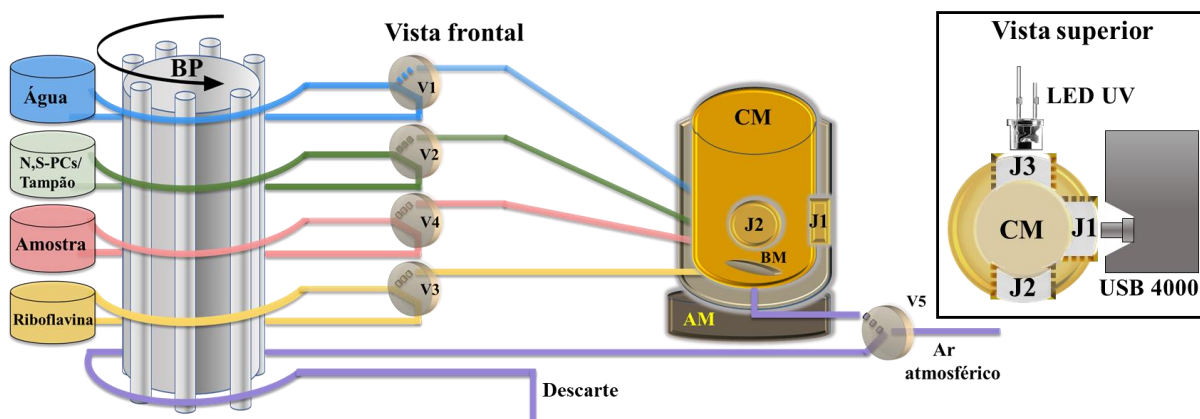


Figura 24 - Diagrama esquemático em dois planos distintos (superior e frontal), do sistema automático fluxo-batelada proposto. BP: bomba peristáltica, V: válvulas solenoides, CM: câmara de mistura, J: Janelas de quartzo; AM: agitador magnético, BM: barra magnética.

O preenchimento dos canais é feito com o acionamento das válvulas V1, V2, V3, V4, simultaneamente, por 10 s, e posteriormente a válvula V5 é acionada por 22 s, de modo a esvaziar a CM. Nesta etapa, não há agitação.

A troca de amostra é feita com o líquido da mesma sendo bombeado através do respectivo canal (válvula V4), expulsando o conteúdo da amostra anterior até a CM, de onde é aspirada ao descarte por 15 s. Nesta etapa também não há agitação.

No sistema proposto, a água possui dupla finalidade, eis que serve tanto para diluir as soluções, quanto para efetuar a limpeza da CM, que é feita com o acionamento da válvula correspondente à água (V1) por 18,05 s, em seguida, do AM (V5), por 3,0 s, e acionando-se o descarte (V5) por 22 s. Recomenda-se fazer a limpeza pelo menos em duplicata, para evitar contaminações.

Quando excitados até 400 nm, vinhos e cervejas são fortemente luminescentes devido a presença de RF e outros corantes, o que ocasiona, além do efeito solvente caracterizado pelo aumento da intensidade de emissão da RF, um efeito de matriz, de modo que a emissão total de fluorescência da amostra não é diretamente proporcional ao conteúdo de RF, a combinação desses dois efeitos faz necessário se utilizar o método de adição de padrão para contornar o problema (Bonamore et al., 2016). Tanto na aquisição da curva de calibração quanto no processo de adição de padrões, a limpeza do sistema é efetuada repetidas vezes.

No sistema automático FBA, as diluições foram processadas de maneira automática até o limite da capacidade volumétrica da câmara de mistura (1.800 μL). Tanto para análise dos padrões de RF quanto para as amostras de vinhos e cervejas, foram adicionados volumes fixos, da mistura de NSPCs/tampão fosfato. Adicionando-se então a solução padrão ou amostra, nos volumes adequados para a confecção da curva de calibração ou procedimento de análise por adição de padrões, completa-se então o volume com água deionizada.

Na Figura 25, estão resumidas as sete etapas do procedimento automático sequencial, com os tempos de acionamento das válvulas solenoides para a construção da curva de calibração para cada padrão de RF, diluído a partir de solução estoque de 1,00 mg L^{-1} , utilizada na análise de cervejas e vinhos, desde o bombeamento da água, de modo a completar o volume da CM, estabelecido em 1800 μL (1). A mistura NSPCs/tampão, adicionada (2) é proporcional às quantidades já estabelecidas para os mesmos, de acordo com a melhor performance obtida no sistema, quais sejam: 15 % (v v^{-1}) para os NSPCs, e 12,5 % (v v^{-1}) para o tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 6,9). O padrão de RF foi introduzido até a concentração de 0,600 mg L^{-1} (3).

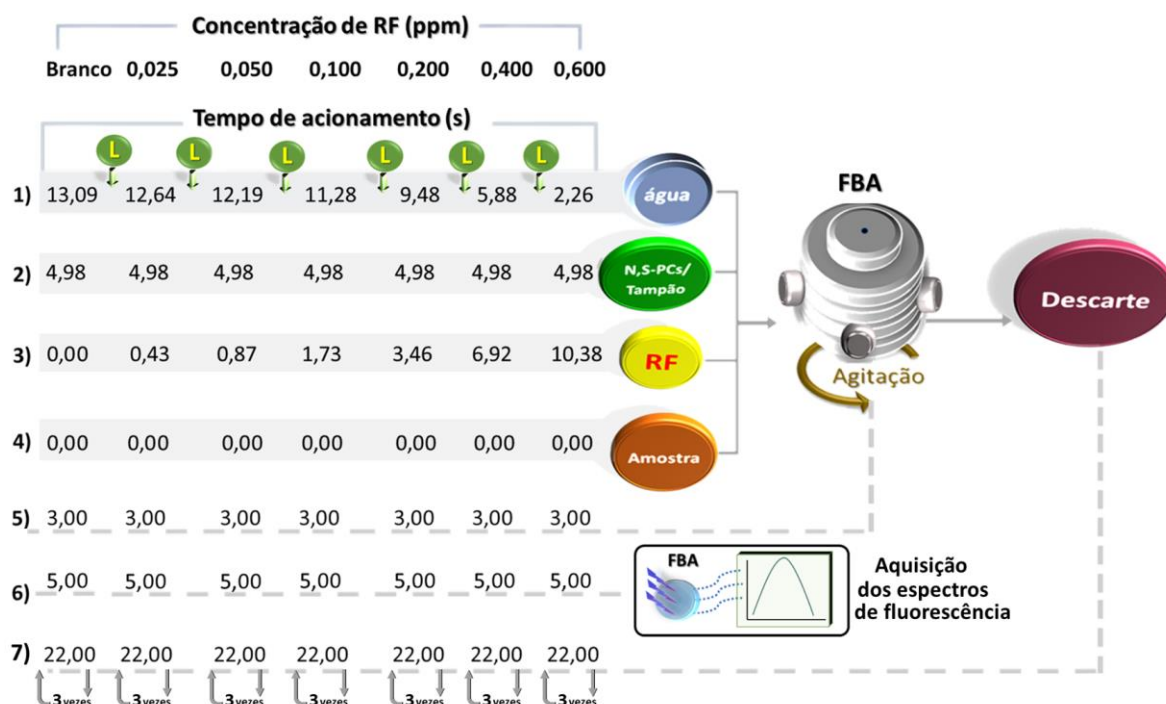


Figura 25 - Esquema representativo dos tempos de acionamento das válvulas referentes às sete etapas para medida em triplicata dos padrões de RF (0,025 a 0,600 mg L⁻¹), com o FBA proposto, indicando a adição de água (1), de NSPCs/tampão (2), padrões de RF (3) agitação (5), aquisição de espectros (6), descarte (7) e a limpeza dos canais em duplicata (representada pelo ícone L) entre cada sequência.

Para a curva analítica, não há introdução de solução de amostras (4). Cada medida é realizada em triplicata, de acordo com a indicação na extremidade inferior da Figura 25.

No procedimento de adição de padrão (Figura 25) o tempo de agitação (5), e a aspiração do conteúdo da CM para o descarte (7) permanecem fixos. A aquisição do espectro de fluorescência, registrado com excitação em 380 nm e emissão máxima em 440 nm (6), se dá após os três segundos de agitação da mistura (5). Como descrito anteriormente, o ícone “L”, indica a limpeza dos canais, realizada em duplicata e ao final de cada sequência. Os tempos de bombeamento, agitação, aquisição dos espectros e descarte envolvendo a CM, mantém constantes as condições de análise e as proporções dos constituintes no processo de confecção da curva analítica, perfazendo um volume total constante de 1.800 µL.

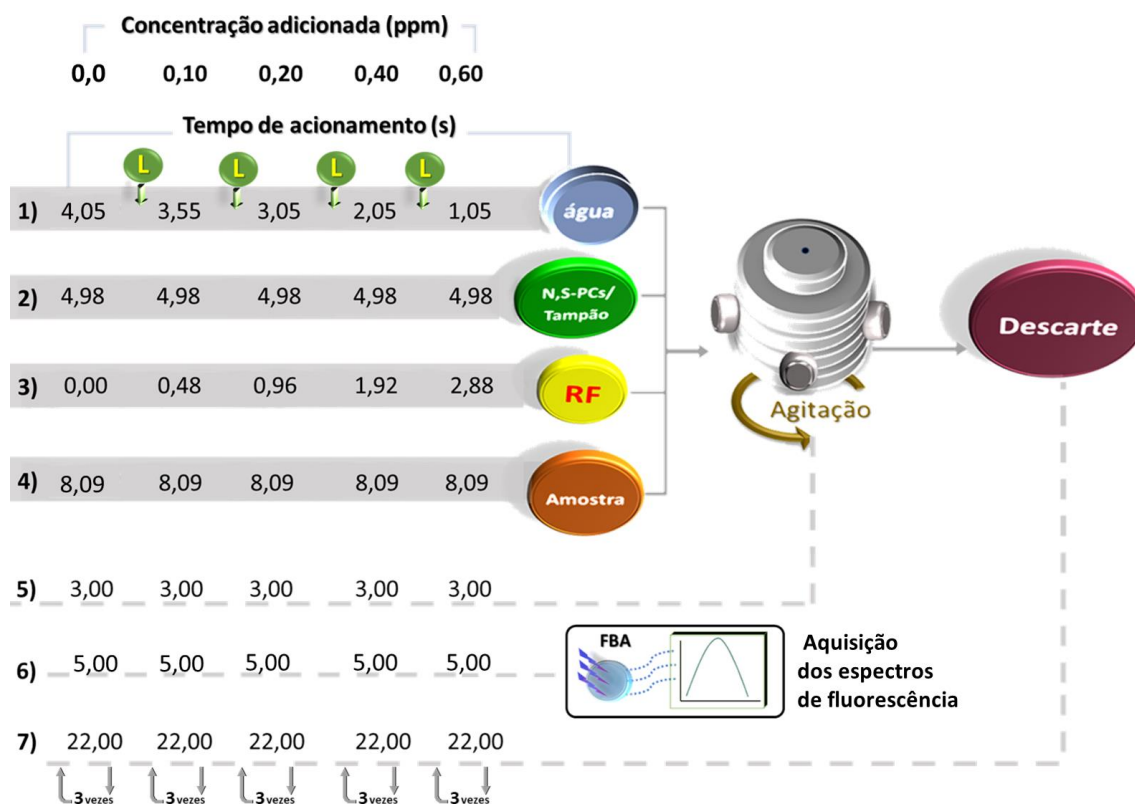



Figura 26 - Esquema representativo dos tempos de acionamento das válvulas referentes às sete etapas para medida em triplicata (destaque no final) de cada adição do padrão RF (0,1 a 0,6 mg L⁻¹), no processo de construção da curva de calibração com o FBA proposto, indicando a limpeza dos canais em duplicata (representada pelo ícone ) entre cada sequência.

Após a obtenção da curva analítica, o sistema FBA foi utilizado para determinação de RF em amostras de vinhos e cervejas, utilizando-se o método da adição de padrão. Para as amostras de bebidas, conforme descrito anteriormente, nenhum tratamento prévio além da diluição foi necessário. Para melhor compreensão, tais procedimentos encontram-se sistematizados na Figura 26, e serão comentados de maneira detalhada a seguir:

Para cada amostra, preparou-se de maneira automática, a partir do sistema FBA, o branco e mais quatro soluções contendo alíquotas idênticas com 0,9 mL do analito, níveis adicionais e crescentes de solução padrão de RF, também idênticas, nos volumes. O volume final, equivale à capacidade da CM do FBA, estabelecido em 1800 µL, sendo completado com água deionizada (1), os volumes da mistura NSPCs/tampão permaneceram constantes (2), iguais àqueles utilizados na curva de calibração (0,495 mL ou 4,98 s). Uma solução estoque de RF, de concentração 3,6 mg L⁻¹, foi utilizada para adição de padrões, sendo diluída automaticamente pelo FBA, para atingir as concentrações adicionadas de 0,0; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60 mg L⁻¹ (3), resultando em concentrações adicionais de: 0,0; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60 mg L⁻¹. Um volume de 900 µL (8,09 s) de cada bebida, representando uma diluição de 1:1, foi introduzido na CM após

filtração em membrana de 0,4 µm (4). A agitação foi fixada em 3s (5), seguida da aquisição do espectro de fluorescência em triplicata a partir de 380 nm de excitação e 440 nm de emissão (6). Após cada medida, ocorreu o descarte do conteúdo da CM (7), e a limpeza dos canais (em duplicata, representadas pelo ícone “L”). O sistema ainda proporciona o registro dos espectros segundo parâmetros de suavização pré-estabelecidos, e armazena os dados (em computador pessoal, arquivos “.txt”) para posterior análise.

Relacionou-se o volume de padrão adicionado com o sinal analítico obtido (eficiência de fluorescência ou EFRET%), construindo-se a partir daí a curva analítica referente ao processo de adição de padrão, que pode ser representado por: $Y = A + BX$ (equação genérica da reta).

Utilizou-se a equação 8, para determinação da concentração de cada amostra em questão:

$$C_x = \frac{-V_p C_p}{V_x} \times 2 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde, V_p é o valor do volume da solução estoque adicionado; V_x é o volume da amostra (constante); C_p é a concentração do padrão ou estoque (constante) e o fator 2, se deve à diluição sofrida pela amostra. Utilizou-se uma solução estoque de RF de concentração 3,60 mg L⁻¹.

Como o V_s também pode ser encontrado por intermédio da razão entre o intercepto A, e a inclinação B, (A/B) da curva analítica. A equação também pode ser escrita da seguinte forma:

$$C_{amostra} = \frac{A C_p}{B V_x} \quad (\text{Equação 9})$$

3.7.3.1 Programa de controle

Foi utilizado o programa Labview 2013[®] para elaborar uma rotina de controle e gerenciamento do sistema automático FBA, com interface amigável, elaborada para a realização dos procedimentos de maneira simplificada, como pode ser visto na Figura 27, permitindo ao usuário o controle das diversas etapas da análise, conforme previsto no método.

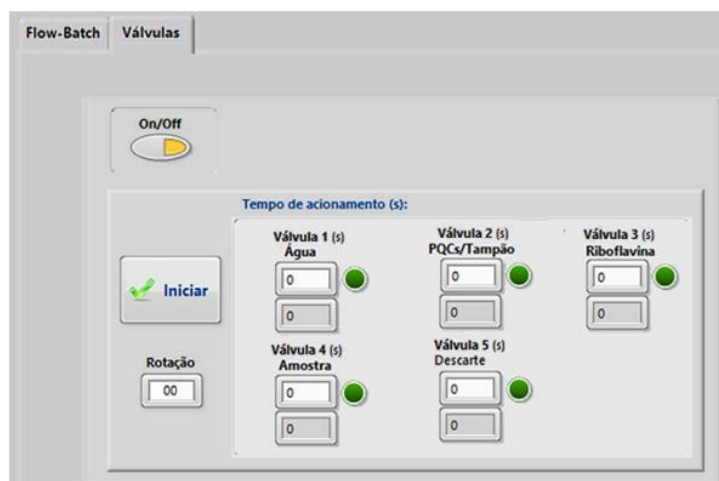


Figura 27 - Interface do programa de gerenciamento do estudo das vazões individuais em cada linha de fluxo.

Os volumes de líquidos impulsionados pela bomba peristáltica, adicionados ou aspirados no sistema FBA, são diretamente proporcionais aos tempos de acionamento das válvulas solenoides, de modo que, é possível que se determine as vazões para cada canal. Para tanto, é necessário encontrar a relação entre o tempo de abertura da válvula e o volume de líquido adicionado ou aspirado.

Para facilitar o procedimento de determinação da vazão em cada canal, utilizou-se a aba “válvulas” da interface do programa de controle e gerenciamento do sistema automático FBA, mostrado na Figura 27, coletando-se diretamente os líquidos impulsionados em intervalos de tempo pré-determinados, em uma balança analítica, obtendo-se assim, as massas dos mesmos. A partir do conhecimento do valor das densidades das soluções, foram estimados os volumes e as vazões (mL s^{-1}) para cada válvula solenoide.

O programa também permitiu o controle das demais etapas envolvidas na análise, tais como: registro e armazenamento dos dados, construção de gráficos analíticos. A implementação desse conjunto de etapas, representa os procedimentos analíticos do método automático proposto através da configuração, de acordo com o mesmo, dos parâmetros de tempo de abertura das válvulas, tempo de mistura e descarte, número de replicatas, tipo de dados da curva, entre outros.

Na Figura 28, está representada a interface do programa de controle, na aba “Flow-Batch”, na qual o usuário estabelece os parâmetros de análise do sistema FBA-Fluorescência. Antes de cada análise, o mesmo deve selecionar a opção disponível na caixa de controle “limpeza”, indicando quantos ciclos deseja realizar, e especificar o tempo de acionamento da válvula V1, empregada para adição de água, em seguida, acionar o botão “limpeza”, e depois, o botão “iniciar”.

O usuário poderá ainda optar entre realizar a análise de “Amostra/Padrões”, “Troca de amostra” ou proceder com o preenchimento dos canais do sistema antes de iniciar a análise, e a cada vez que houver alteração do conteúdo do reservatório de amostra e de reagente, como por exemplo, na troca de padrões ou amostras.

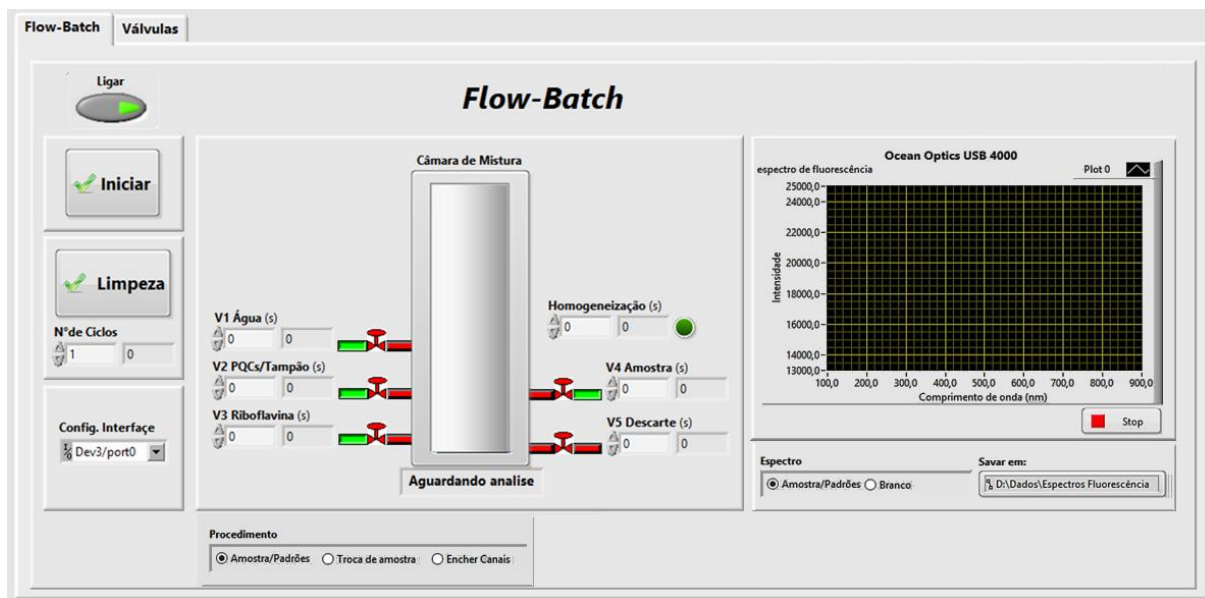


Figura 28 - Interface do programa de controle do sistema FBA proposto, dividida de acordo com os procedimentos atribuídos em virtude do método proposto. Do lado esquerdo, pode ser visto os botões de início do processo ou limpeza dos canais, com as devidas configurações. No centro, o controle adição dos líquidos e suas respectivas válvulas, e do lado direito, o controle do espectrofluorímetro portátil.

No centro da Figura 28, pode ser visto o controle adição dos líquidos para as respectivas válvulas, o qual é utilizado após a determinação da vazão das mesmas. No lado direito da mesma Figura, há a captura e registro gráfico do espectro de fluorescência da “Amostra/Padrão”, ou do “Branco analítico”, bem como a indicação do local de armazenamento dos dados, na extensão “txt”.

3.7.4 Métodos de referência para determinação de RF

3.7.4.1 Para comprimidos multivitamínicos

O procedimento de referência para comprimidos multivitamínicos foi realizado tendo por base o método descrito pela AOAC (Sim, Kim, Lee, 2016), empregando HPLC com detecção por arranjo de diodos (seção 2.8.3). Utilizou-se uma coluna cromatográfica do tipo C18. A fase móvel A consiste em 10 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (com pH ajustado para 3,8 com ácido fórmico), e a fase móvel B é metanol. A corrida cromatográfica se dá usando gradientes de diluição de A e B em função do tempo como segue: 0–9 min, 3–15 % B; 9–10 min, 15–20 %

B; 10–20 min, 20–25 % B; e 20–30 min, 25–55 % B. A coluna então é equilibrada por uma mistura com 3 % B por 15 min, a uma vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de injeção é de $10 \text{ }\mu\text{L}$

No momento da injeção (em triplicata) na coluna cromatográfica, tanto os padrões quanto as amostras se mantêm a pH 6,9 com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, adicionado na proporção 1:8 (v v^{-1}) e submetidos a filtração prévia em filtro seringa de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Para a RF, o comprimento de onda utilizado na detecção foi de 268 nm.

As amostras são preparadas (conforme descrito na seção 3.3) pulverizando-se cinco comprimidos de cada amostra e transferindo para um béquer, juntando-se 50 mL de água deionizada, em seguida, a mistura é sonicada por 15 min, e agita-se por 30 minutos. Filtra-se e lava-se a fração insolúvel com água deionizada, até o volume de 250 mL em balão volumétrico. Guarda-se ao abrigo da luz e sob refrigeração para uso no mesmo dia.

3.7.4.2 Para vinhos e cervejas

O procedimento de referência para vinhos e cervejas realizou-se tendo por base o método descrito por Andrés-Lacueva, Mattivi e Tonon (1998). O qual utiliza a técnica de HPLC com coluna cromatográfica C18, e detecção direta por fluorescência, aplicando para a RF os comprimentos de onda de excitação e emissão 265 e 525 nm, respectivamente. O tempo de corrida cromatográfica é de cerca de 7 minutos. A fase móvel A consiste em um tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, levado a pH 3,0 com H_3PO_4 e o solvente B é acetonitrila. A corrida cromatográfica se dá usando gradientes de diluição de A e B em função do tempo como segue: 0–8 min, 95 % A; 8–12 min, 75 % A; 12–15 min, 95 % A, a uma vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, e o volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$. O pré-tratamento dispensado para os padrões de RF é a diluição com mistura de 20 % (v v^{-1}) de acetonitrila e 80 % (v v^{-1}) da fase móvel A, e para as amostras é feita apenas a diluição 1:3 (v v^{-1}) com água, seguida de filtração em membrana micro porosa de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização dos pontos de carbono

4.1.1 Síntese e otimização dos pontos de carbono

Os NSPCs foram produzidos por irradiação de micro-ondas, a partir da biomassa de limão e cebola em meio amoniacal. Considerando a presença de dezenas de substâncias na cebola, entre elas, açúcares (glicose, frutose e sacarose), fenóis, incluindo a quercetina, compostos sulfurados, cetonas, aldeídos e cisteína (Liguori et al., 2017; Edwards et al., 1994). E devido à presença de quantidade considerável de ácidos cítrico e L-ascórbico no limão, o mecanismo envolvido na síntese para a produção dos NSPCs, provavelmente se assemelha àquele descrito por Mondal e colaboradores (2016), no qual as nanopartículas apresentam em sua estrutura superficial, além de carboxilas e hidroxilas em abundância, centros grafíticos e armadilhas emissivas constituídas por anéis semelhantes à porfirina. Contudo, devido também à presença de compostos sulfurados envolvidos na síntese dos NSPCs, a síntese das nanopartículas provavelmente seguiu complementarmente a rota de incorporação de sulfatos e outros grupos sulfurados como funcionalizantes adicionais, como descrito por Wang e colaboradores (2015), eis que estes elementos se encontram na composição química das nanopartículas.

4.1.2 Condições ótimas de síntese dos NSPCs

Uma vez sintetizados os NSPCs, estes foram avaliados em termos de sua emissão fluorescente através de um ensaio simples, no qual os NSPCs foram expostos a uma luz negra. O resultado positivo com a emissão fluorescente aparentemente mais intensa, pode evidenciar a ocorrência da funcionalização com N e S.

Na otimização da síntese dos NSPCS, a melhor razão volumétrica entre as biomassas, produziu o RQF de 23,6% (Figura 29a), considerado bastante satisfatório quando comparado, por exemplo a estudos como: o de Mondal e colaboradores (2016), que utilizou biomassa obtendo um RQF de 38 % para uma síntese hidrotérmica com tempo de 6h a 180 °C, o de Sahu e colaboradores, que obteve PCs com RQF de 26 % utilizando suco de laranja, com síntese hidrotérmica no tempo de 2,5 h a 120 °C, e De e Karak (2013) que produziram PCs utilizando banana (150 °C, 4 h) obtendo um RQF de 8,95%.

Após estabelecidas as proporções volumétricas dos precursores, verificou-se que o tempo adequado de irradiação é de 6 minutos (Figura 29b).

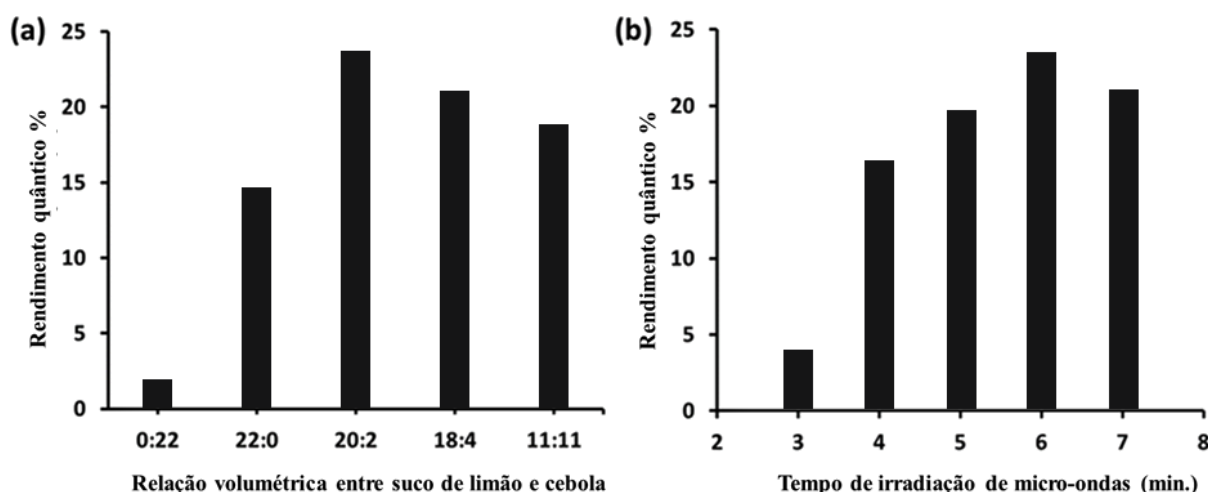


Figura 29 - Rendimentos quânticos dos NSPCs obtidos, (a) em função de diferentes proporções entre sucos de limão e cebola, com o melhor valor na proporção de 20:2; (b) em função do tempo de irradiação com microondas, com o melhor rendimento em 6 minutos.

A relação entre limão e cebola (20:2) permite um melhor RQF (Figura 29a), possivelmente em razão da alta concentração dos ácidos cítrico e ascórbico contidos no limão (Mondal et al., 2016).

Os centros emissivos funcionalizados, formados em função do tempo de irradiação de micro-ondas possivelmente começam a ser oxidados após 6 minutos de irradiação, levando a um menor RQF nos PCs (Figura 29b).

4.1.3 Rendimento quântico de fluorescência

O RQF dos NSPCs foi determinado conforme a literatura (Williams, Winfield, 1983; Tian et al., 2017; Brouwer, 2011). Empregando-se o padrão sulfato de quinino, cujo RQF é de 54%.

Utilizou-se a equação 1 para o cálculo do RQF. Os NSPCs obtidos apresentaram RQF de 23,6 %, quando comparados com o padrão de referência sulfato de quinino, medidos a um comprimento de onda de excitação de 380 nm. Os valores estão de acordo com os reportados na literatura, utilizando bioprecusores de carbono (Sahu et al., 2012; Mondal et al., 2016; De e Karak, 2013; Bandi et al., 2016; Basavaiah et al., 2018).

4.1.4 Caracterização dos NSPCs

A incorporação dos elementos N e S foi confirmada pela composição elementar (tabela 5) dos NSPCs, determinada pelos métodos: Kjeldahl, para nitrogênio total (Thiex et al., 2002),

e para os demais constituintes, por espectrometria sequencial de fluorescência de raios X por comprimento de onda (WD - XRF).

Tabela 5 - Composição elementar dos NSPCs utilizados no método proposto.

Elemento	% (m m ⁻¹)
C	85,22
N	8,83
O	4,80
S	0,33
Outros*	0,82

*Cl, K, Si, P, Ca, Fe

Os espectros de FTIR indicam a incorporação bem-sucedida dos grupos amino, hidroxila, sulfônico e sulfito nas superfícies dos PCs, conferindo alta polaridade e solubilidade em água dos PCs (Wang et al., 2015d). Estes grupos funcionais de superfície dos NSPCs obtidos foram identificados por espectroscopia de FTIR. Como mostrado na Figura 30, os máximos em 3.400, 3.200 e 3.050 cm⁻¹ foram atribuídos a vibrações de estiramento de O-H, N-H e C-H, respectivamente (Madrakian et al., 2017). Os picos na região de 1.575 - 1.700 cm⁻¹ podem representar vibrações de estiramento de C = O, C = N e vibração de dobramento de N-H (Shen et al., 2017). Além disso, os picos na faixa de 1390–1490 cm⁻¹ podem ser atribuídos aos grupos N-H, C-N e COO⁻ (Sun et al., 2013). Os picos ocorridos na faixa de 1.300, 1.190 e 1.080 cm⁻¹ podem ser atribuídos às vibrações de estiramento C=S, C-S e -SO₃⁻, sugerindo a existência de grupos sulfônicos (Wang et al., 2015d; Sun et al., 2013; Peng, Travas-Sejdic, 2009).

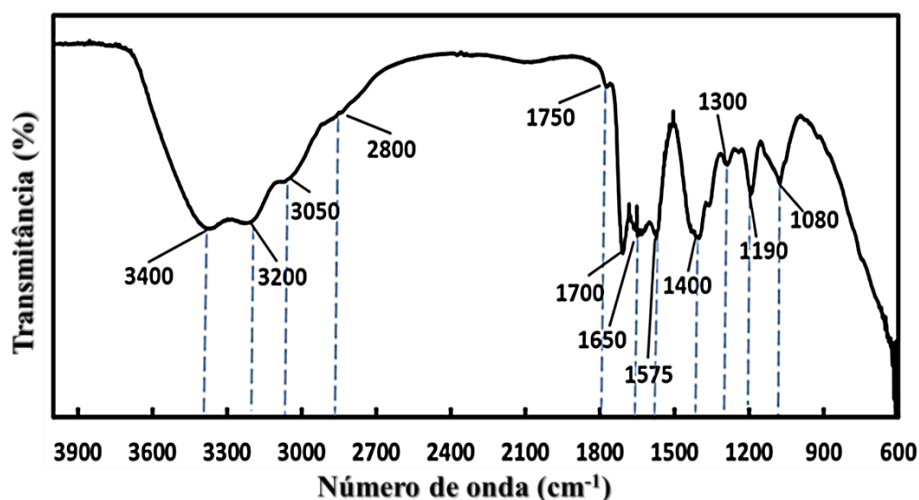


Figura 30 - Espectro FTIR, obtido a partir dos NSPCs, onde se verifica a possível presença de alguns importantes grupos funcionais como, amino, hidroxila e sulfito, entre outros.

O padrão de DRX dos NSPCs (Figura 31) mostra uma reflexão de baixa intensidade centrada em torno de 23° , o que é característico de uma estrutura gráfitica fracamente cristalina, com considerável número de sítios defeituosos em posições aleatórias (Gogoi, Karak, 2017).

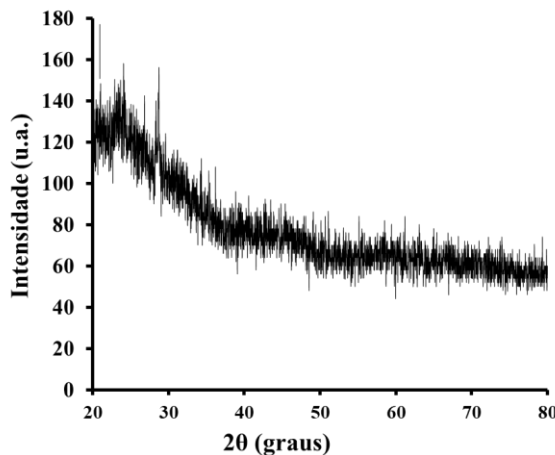


Figura 31 - Diagrama típico dos NSPCs, com um pico em torno de 23° , indicando baixa cristalinidade dos pontos de carbono, possivelmente devida aos grupos funcionais superficiais.

O ligeiro aumento observado em $2\theta = 45^\circ$ representaria uma distância interplanar de 0,2 nm, portanto mais estreito que o espaçamento gráfitico usual, o que também corrobora com a teoria acerca da desorganização estrutural dos PCs (Baker e Baker, 2010).

O pico suave observado em aproximadamente $2\theta = 23^\circ$ corresponde com a distância interplanar de 0,39, superior à do grafite que é 0,34 nm, que se mostra de acordo com as imagens apresentadas pela técnica de microscopia TEM. Dessa maneira, há a evidência do espaçamento superior ao do grafite, o que é um indicativo da existência de grupos funcionais perpendiculares aos planos gráfitcos dos NSPCs (Gogoi e Karak, 2017).

A morfologia e tamanho dos PCs preparados foram observados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A imagem da Figura 32 mostra que os NSPCs são quase esféricos e exibem uma estreita faixa de dispersão com partículas uniformes, que foi dimensionada com auxílio do programa ImageJ®, resultando em uma faixa de tamanho de 4,23 a 8,22 nm com diâmetro médio de 6,15 nm.

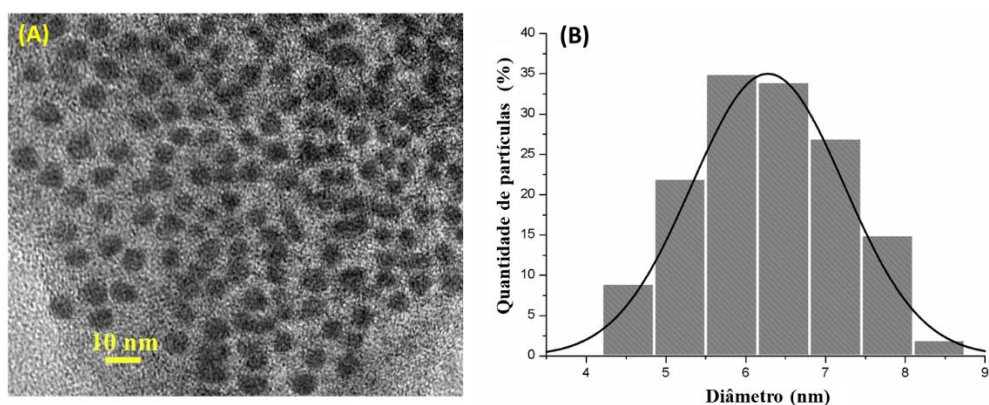


Figura 32 - (A) Imagem de TEM dos NSPCs de dimensão aproximada de 6 nm e morfologia quase esférica, em comparação com a barra de escala que corresponde a 10 nm; (B) Gráfico em histograma representando a dispersão dimensional dos NSPCs, entre 4,23 e 8,22 nm, indicando uma distribuição normal, e o tamanho médio de 6,15 nm.

A Figura 33 mostra outra imagem de TEM dos NSPCs, indicando um espaçamento intercamadas de 0,39 nm, no entanto, tal espaçamento é numericamente superior ao espaçamento interplanar da estrutura gráfica pura (~0,34 nm). Tal fato pode ser atribuído à presença de grupos funcionalizantes, contendo átomos de oxigênio, nitrogênio ou enxofre, na estrutura do NSPCs, os quais, intercalados entre as camadas consecutivas, levam a uma maior distância interplanar (Gogoi e Karak, 2017).

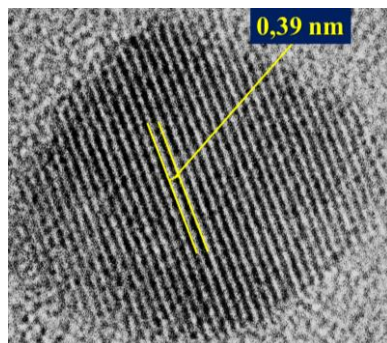


Figura 33 - Imagem de TEM de um NSPC com a visualização dos planos do carbono gráfico medindo décimos de nanômetros, normalmente mais afastados do que o grafite, reforçando a caracterização da possível dopagem do mesmo com grupos funcionais desejados.

As propriedades ópticas da dispersão aquosa dos NSPCs sintetizados ($32,0 \text{ mg L}^{-1}$) em tampão fosfato pH 6,9 são apresentadas na Figura 34. A solução de NSPCs exibiu comportamento de emissão dependente de excitação (Figura 34A), semelhante ao relatado na literatura (Mondal et al., 2016; Kundu et al., 2016), que pode estar associado aos estados de superfície que afetam o *bandgap*. Como o comprimento de onda de excitação aumentou de 290 para 400 nm (com incremento de 10 nm), o máximo de emissão foi gradualmente alterada para

comprimentos de onda mais elevados e a emissão mais intensa pôde ser observada após excitação a 340 nm (Figura 34A).

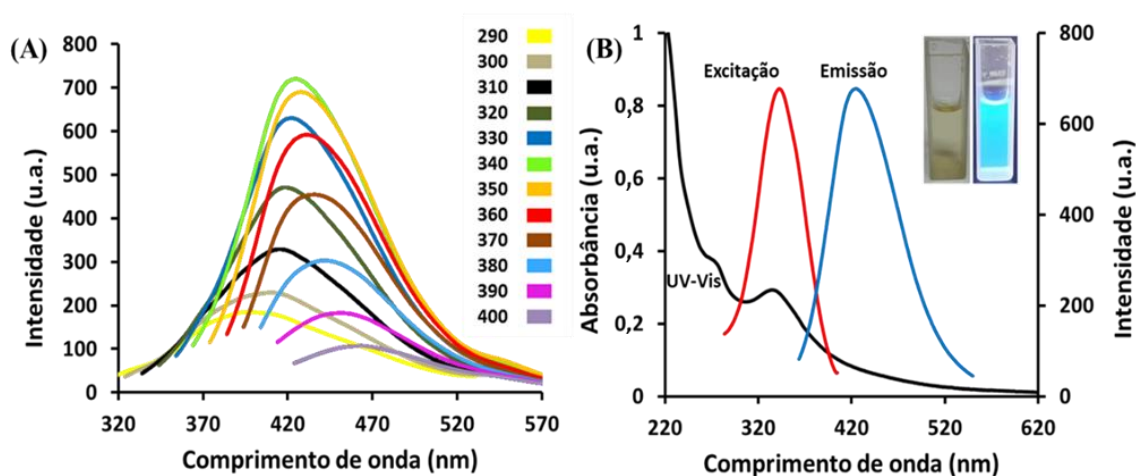


Figura 34 - Espectros de emissão de fluorescência em função do comprimento de onda de excitação, observando-se a 340 nm, a ocorrência da maior intensidade (A); espectro de absorção UV-vis dos NSPCs (linha em preto) e picos de excitação (340 nm, linha vermelha) e emissão (425 nm, linha azul), com o destaque para a fluorescência azulada dos NSPCs a 365 nm, no canto superior direito da figura B.

Ainda na Figura 34, o espectro de absorção UV-Vis (Figura 34B) exibe um ombro a 280 nm que pode ser atribuído à transição $\pi-\pi^*$ dos domínios sp^2 aromáticos, e um pico largo de absorção a 340 nm que pode ser atribuído à transição $n-\pi^*$ da ligação C=O (Lu et al., 2015; Lu et al., 2016). Os espectros de fluorescência mostram que os CDs têm picos de excitação e emissão a 340 nm (linha vermelha) e a 425 nm (linha azul) (B) e exibem uma cor amarela à luz natural e uma cor azul clara sob luz UV a 365 nm (destaque (B)).

A fim de demonstrar a viabilidade do sistema de detecção FRET entre os NSPCs e a RF, os espectros de fluorescência e absorção dos NSPCs e da RF foram investigados. Na Figura 35A, há uma região de sobreposição (cor cinza) evidente entre o espectro de absorção de RF (em azul) e o espectro de emissão de NSPCs (em vermelho), indicando a possibilidade de um processo FRET entre o doador NSPCs e o receptor, RF (Figura 35A).

A presença de grupos $-NH$ e $C=O$ presentes na RF, pode exercer uma forte atração por grupos $-OH$ e $-COOH$, existentes na superfície dos NSPCs para formar ligações de hidrogênio e diminuir a distância espacial entre NSPCs e RF, o que pode auxiliar o par NSPCs/RF a agir como um par FRET eficaz (Wang et al., 2015a; Sapsford, Berti, Medintz, 2006).

A escolha do comprimento de onda de excitação utilizado para a determinação quantitativa de RF se deu a partir de comparações entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas pela eficiência de FRET (EFRET%) para comprimentos de onda de excitação

de 340 a 400 nm, dos NSPCs em presença de soluções de RF de concentrações na faixa de 0,1 a 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme a figura 35C.

Diante dos resultados, decidiu-se por escolher que a excitação de 380 nm, de maior sensibilidade, seria a mais indicada para se proceder com o método proposto.

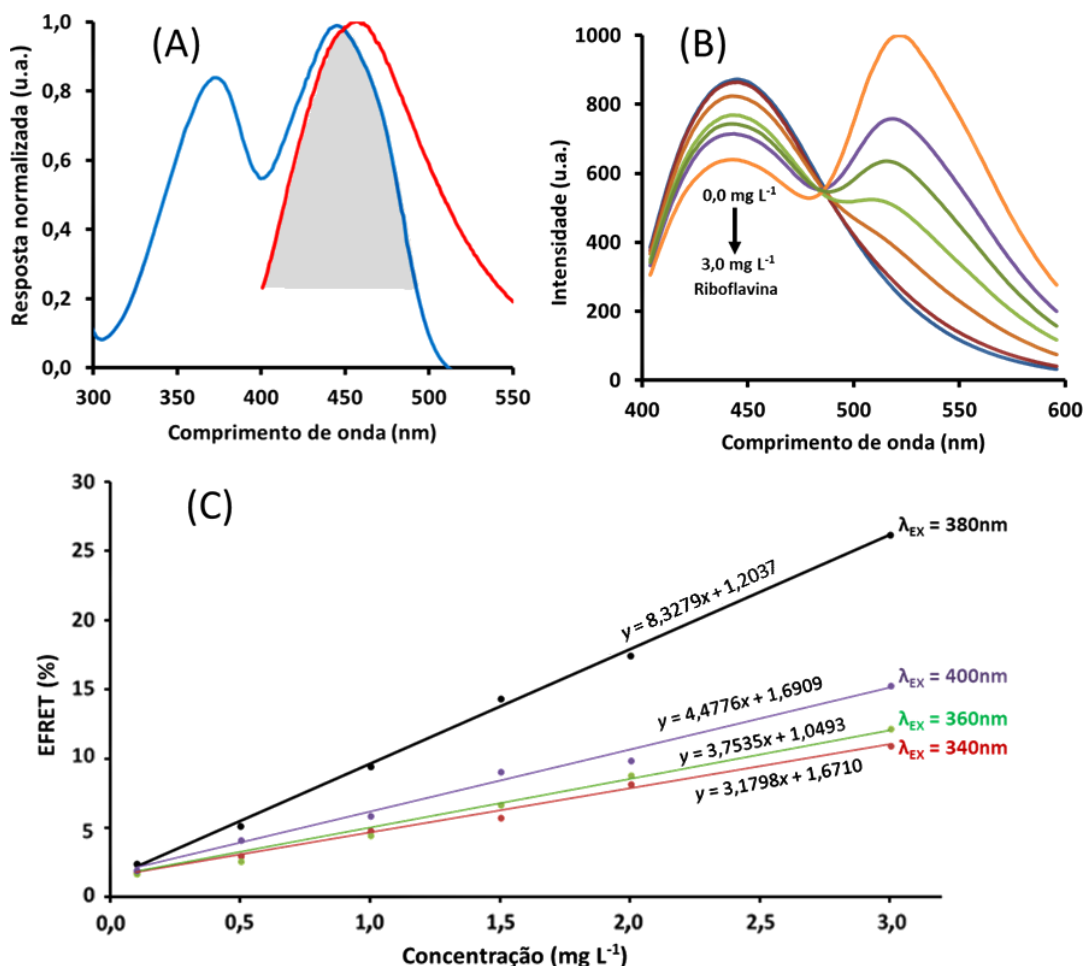


Figura 35 - (A) Sobreposição espectral (cinza), da absorção de riboflavina (azul) e emissão dos NSPCs (vermelho). (B) Espectros de fluorescência de PCs na presença de diferentes quantidades de riboflavina, $\lambda_{\text{ex}} = 380\text{nm}$. (C) A eficiência do processo de FRET como uma função da concentração de riboflavina com o comprimento de onda de excitação dos NSPCs/riboflavina variando de 340 a 400 nm.

Os espectros de emissão (Figura 35B) apresentam um máximo em 440 que é respectivo à emissão dos NSPCs e outro máximo a 520 nm, correspondente à emissão da RF. Os espectros dos NSPCs apresentam uma inibição de fluorescência a 440 nm, provocada pelo aumento da concentração de RF (0,0 a 3,0 mg L^{-1}) em tampão fosfato (pH 6,9), enquanto a intensidade de emissão de RF a 520 nm aumenta, que é um indicativo de ocorrência do fenômeno FRET (Kundu et al.,2013; Kundu et al.,2016) esse efeito é facilitado pelas características dos grupos -OH e -COOH e -SO₃H contidos nos NSPCs, os quais, ao exercerem forte atração pelos grupos

C=O e -NH presentes na RF, possivelmente favorecem o posicionamento necessário para efetivação do processo de FRET, como reportado anteriormente (Wang et al., 2015a; Sapsford, Berti, Medintz, 2006).

Em consequência disso, a capacidade desse sistema em detectar a RF foi então avaliada usando a eficiência do processo FRET (EFRET%).

Para melhor avaliação acerca da possibilidade de ocorrência do processo de FRET, a distância de interação entre NSPCs e riboflavina foi calculada usando a distância de Förster descrita na literatura (Kundu, Nandi, Das, 2016), entre o par de NSPCs (doador) - RF (aceitador), a equação para o cálculo da distância de Förster (equação 2) está descrita na parte experimental. A referida distância foi estimada em 5,89 nm, muito abaixo da distância máxima (~ 10 nm) entre doador e um aceitador necessário para o processo FRET, indicando assim, a possibilidade de uma transferência eficiente de energia (Sapsford, Berti, Medintz, 2006).

4.1.5 Influência da concentração e do pH

Estudou-se a influência causada pela variação de dois parâmetros importantes, na EFRET% desses sistemas RF/NSPCs, mantendo-se a concentração da RF constante ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$). Os parâmetros foram a concentração dos NSPCs e o pH do meio. As respectivas variações adotadas foram 59,2 a 115,0 e 3,0 a 8,0. Observa-se a diminuição de EFRET% para dispersões ácidas ou básicas e os maiores valores ocorrem com o pH do meio em 6,9 (Figura 36a).

O decréscimo de EFRET% observados tanto em meio ácido quanto em meio básico (Figura 36a) pode estar relacionado com a protonação e desprotonação dos grupos funcionalizados na superfície dos NSPCs, o que afeta diretamente o bandgap das nanopartículas (Song et al., 2014). Outra causa (discutida na seção 2.7.1) pode ser a influência do pH na emissão da RF e assim limitar o efeito FRET.

Observa-se também a diminuição do valor de EFRET% para concentrações de NSPCs acima de 98,6 (Figura 36b) que pode estar relacionado com a reabsorção da fluorescência pela própria solução quando a concentração de fluoróforos se encontra elevada (Pavoni et al., 2014).

Diante do exposto, decidiu-se pela escolha do pH 6,9 e da concentração de NSPCs de $98,6 \text{ mg L}^{-1}$.

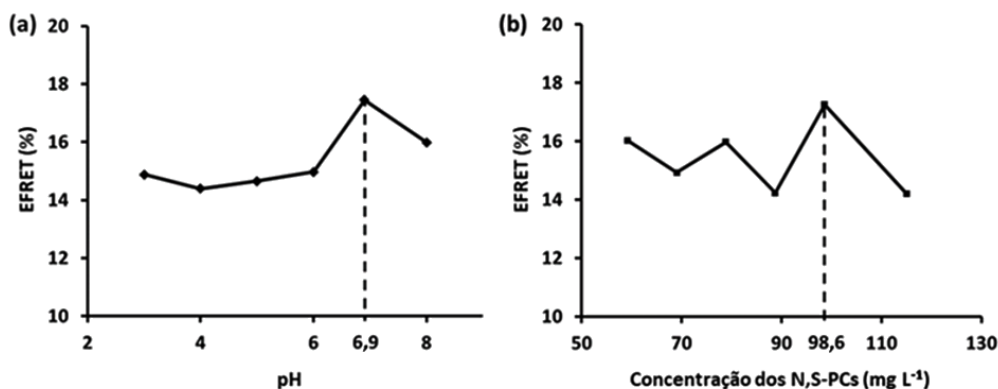


Figura 36 - representação da variação do EFRET do sistema RF/NSPCs em função do pH (a) e da concentração dos NSPCs (b), indicando os maiores valores em pH 6,9 e 98,6 mg L⁻¹ de NSPCs.

4.1.6 Influência do volume do tampão fosfato

Foi realizado um estudo acerca do volume da solução tampão fosfato a ser utilizado no método proposto, de modo que, para as mesmas condições de obtenção da curva analítica (seção 3.7.2) foram testados quatro níveis de inclusão do tampão (figura 37), comparando-se os resultados de EFRET% obtidos.

Ahmad e colaboradores (2013) constataram que em presença de 2,0 mol L⁻¹ de tampão fosfato, soluções de RF sofrem uma redução em sua intensidade de fluorescência em torno de 36%, o que indica uma complexação entre RF e íons HPO₄²⁻. Diante disto, a faixa de estudo encontra-se bem abaixo da concentração descrita como prejudicial à intensidade de fluorescência da RF (Ahmad et al., 2013).

Inclusões de volumes maiores que 250 µL possivelmente podem proporcionar complexação com os NSPCS semelhantes àquelas ocorrida entre os íons HPO₄²⁻ e a RF, causando a desativação dos centros emissores e consequentemente diminuindo o EFRET% do sistema.

Diante do exposto, decidiu-se pela escolha da adição de 250 µL da solução tampão.

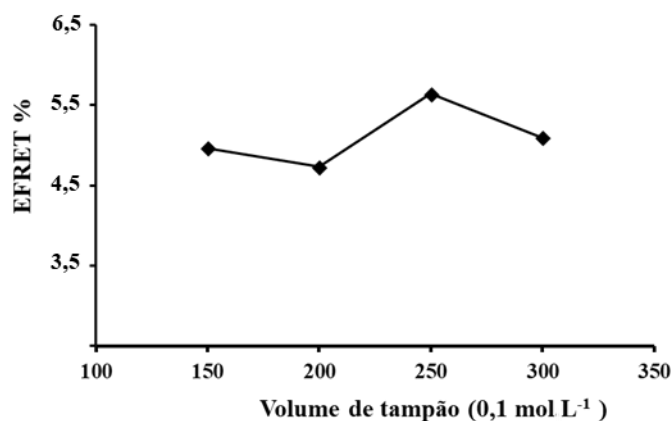


Figura 37 - Relação entre o volume de solução tampão e seu respectivo EFRET%, contra solução contendo 0,5 mg L⁻¹ de RF, com o melhor resultado em 250 µL.

4.1.7 Estudo de interferentes

Foi investigado o estudo de interferentes para o método proposto. Para este propósito, potenciais substâncias interferentes (Brezo et al., 2015), incluindo ácido fólico, ácido cítrico, ácido L-ascórbico e pantotênico, biotina, cianocobalamina, niacina, tiamina, sacarose, D-glicose, frutose, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺ e K⁺ em uma razão entre interferentes/RF 100:1,0 µg mL⁻¹. Um composto é considerado “não interferente” se a mudança de intensidade de fluorescência for de $\pm 5\%$ em comparação com aquela obtida na sua ausência (Brezo et al., 2015). Os interferentes estudados não apresentaram alteração significativa na resposta analítica, como pode ser visto na Figura 38, indicando que o método proposto foi seletivo, sob as condições experimentais estudados.

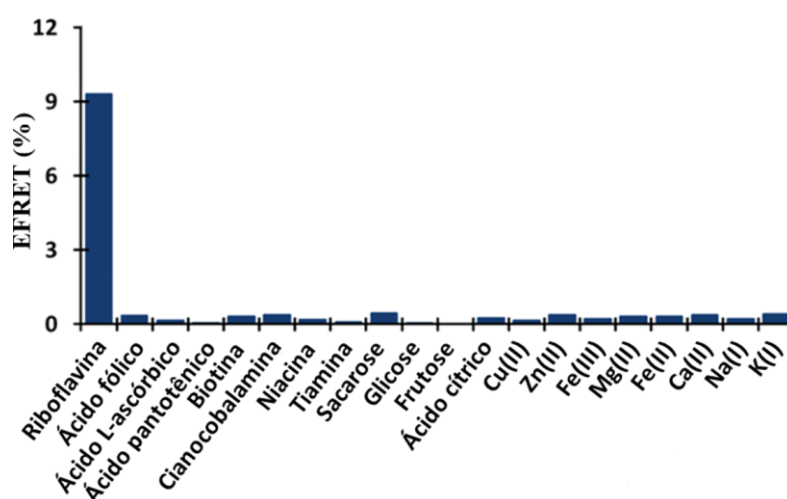


Figura 38 - Teste de seletividade para o método envolvendo o sistema RF/NSPCs na determinação da vitamina em multivitamínicos e bebidas, frente a possíveis interferentes (100 µg mL⁻¹) para a EFRET%. Nenhuma alteração significativa foi observada.

A ausência de interferentes advinda das espécies estudadas no sistema proposto é um indicativo da seletividade satisfatória dos NSPCs na detecção da RF.

4.2 Determinação de RF em suplementos multivitamínicos

4.2.1 Obtenção e validação da curva analítica

Uma curva analítica foi construída para a faixa de concentrações de 0,1 a 3,0 mg L⁻¹ de RF, a partir dos espectros de fluorescência obtidos pelo método automático proposto baseado em NSPCs. Utilizou-se a relação de eficiência de FRET (EFRET%, reportada anteriormente) na construção da curva analítica, já estabelecida na literatura (Wang et al., 2015a; Kundu et al., 2016).

A Figura 39 mostra a curva analítica obtida a partir da utilização do método proposto para determinação de RF em suplementos multivitamínicos.

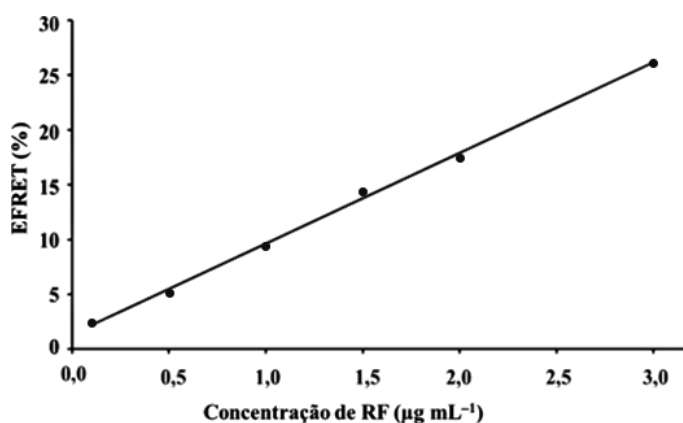


Figura 39 - Curva analítica para a determinação de RF em suplementos multivitamínicos, baseada na concentração de RF *versus* EFRET%.

A curva analítica foi construída a partir dos níveis de concentração 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg L⁻¹ de RF, apresentando um comportamento linear entre o valor de EFRET e a concentração de RF das soluções analíticas. Essa inferência baseada, inicialmente, pela equação da curva de calibração, $y = 8,3279x + 1,2037$, obtida segundo o método dos mínimos quadrados, com um coeficiente de correlação de 0,9979, pode ser confirmada pela análise do gráfico dos resíduos deixado pelo modelo, apresentado na Figura 40, e corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida.

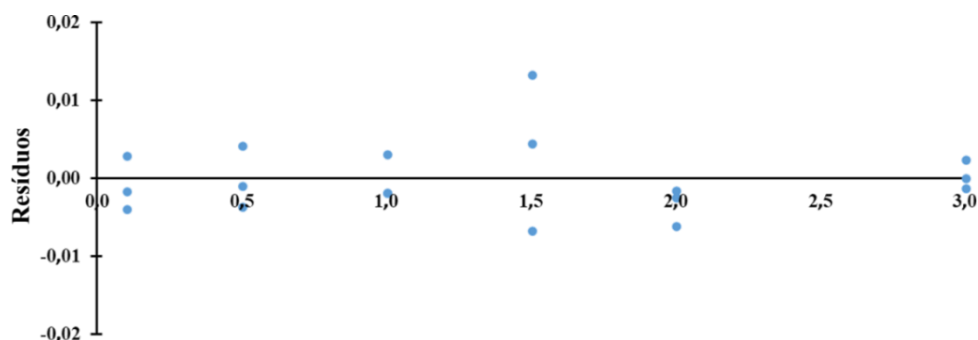


Figura 40 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.

Pode-se observar na Figura 40 a distribuição aleatória dos resíduos ao longo da faixa de concentração estudada. Não se observa nenhum perfil, estrutura ou tendência sistemática que possa evidenciar alguma possível falta de ajuste do modelo construído para o método proposto. Os resultados da aplicação da ANOVA, empregados para corroborar na validação do modelo de calibração, utilizando o método fluorescente automático, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão (R)	$1,14 \times 10^{-1}$	1	$1,14 \times 10^{-1}$	Significância de R
Resíduos (r)	$3,71 \times 10^{-4}$	16	$2,32 \times 10^{-5}$	$\mathbf{MQ_R/MQ_r} = 4,93 \times 10^3$
Falta de ajuste (faj)	$7,93 \times 10^{-5}$	4	$1,98 \times 10^{-5}$	Falta de ajuste
Erro puro (ep)	$2,92 \times 10^{-4}$	12	$2,43 \times 10^{-5}$	$\mathbf{MQ_{faj}/MQ_{ep}} = 0,82$

Para verificar se o modelo obtido não apresenta falta de ajuste, compara-se o valor da relação MQ_{faj}/MQ_{ep} com o valor de $F_{4,12}$ (ponto de distribuição F para 4 e 12 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) que é igual a 3,26. Como o valor obtido pela razão MQ_{faj}/MQ_{ep} para o modelo proposto é menor que o valor de $F_{4,12}$ tabelado, então não existe evidência de falta de ajuste do modelo proposto. Para avaliar a significância estatística da regressão, compara-se o valor da razão MQ_R/MQ_r , cujo valor obtido é $4,93 \times 10^3$ com o valor de distribuição $F_{1,16}$ (igual a 4,49). Conclui-se que há significância na regressão.

4.2.2 Análise das amostras de multivitamínicos e minerais

De acordo com o exposto anteriormente, o modelo é adequado para a determinação da concentração de RF em amostras de suplementos multivitamínicos e minerais. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7 em comparação com o método de referência por HPLC.

A partir dos resultados obtidos, observa-se concordância satisfatória entre os valores do método proposto e o de referência por HPLC. Quando aplicado o teste *t* pareado, os resultados não apresentaram diferenças significativas a um nível de 95% de confiança estatística.

Tabela 7 -Resultados obtidos da determinação da concentração de riboflavina em suplementos multivitamínicos e minerais usando o método proposto e o método de referência (n=3).

Amostra	Método proposto ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}^a$)	Método de referência ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}^a$)
1	$0,57 \pm 0,00$	$0,56 \pm 0,02$
2	$0,57 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,02$
3	$0,36 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,00$
4	$1,11 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,01$
5	$0,90 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,01$
6	$0,84 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,02$
7	$0,41 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,02$
8	$0,46 \pm 0,00$	$0,45 \pm 0,01$
9	$0,44 \pm 0,00$	$0,44 \pm 0,01$

^a DP: desvio padrão de triplicatas.

Os parâmetros do modelo de calibração obtido por regressão linear, para o método proposto, são apresentados na Tabela 8. Considerando que o modelo não apresentou falta de ajuste, descrevendo uma relação linear adequada entre o sinal analítico de fluorescência com a concentração de RF, com um coeficiente de correlação de 0,9979 na faixa de calibração, foram estimados os erros padrão dos coeficientes de regressão, b_0 e b_1 . Para isso, foi utilizado o valor da média quadrática residual (MQ_r) como estimativa da variância populacional dos erros aleatórios ao longo da regressão.

Tabela 8 -Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.

$y = b_0 + b_1 x$	
$b_0 \pm t S_{b_0}$	$b_1 \pm t S_{b_1}$
$1,2037 \pm 0,4675$	$8,3279 \pm 0,4472$

A partir das estimativas e erros padrão de b_0 e b_1 , obteve-se o intervalo de 95% de confiança para os parâmetros populacionais (β_0 e β_1) do modelo. Os limites obtidos mostram que o valor zero não está contido nos intervalos de confiança. Assim, ambos os coeficientes estimados para o modelo linear são estatisticamente significativos e devem ser mantidos na respectiva equação.

Após a validação da curva analítica, foram estimados para o método proposto, os valores dos limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e sensibilidade. Os valores estimados para esses parâmetros de desempenho são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros de desempenho para o método proposto.

LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,001
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,003
Sensibilidade	8,3279

Os valores de LOD, LOQ e sensibilidade estimados para o método fluorescente proposto são satisfatórios, o que torna esse método apropriado para a determinação de RF em multivitamínicos.

4.2.3 Teste de recuperação

Além da comparação com o método de referência, o teste de recuperação é outro meio de avaliar a exatidão para método proposto. Assim, as recuperações foram investigadas usando três suplementos multivitamínicos e minerais diferentes, escolhidos de maneira aleatoria, nos quais, os padrões de RF foram adicionados em três níveis diferentes. Valores satisfatórios de recuperação foram obtidos para as três amostras analisadas, conforme pode ser observado na Tabela 10.

Um volume de 100 μL da amostra foi adicionado a cada padrão de RF utilizado. Em seguida, foram adicionados 250 μL da solução tampão, 300 μL de NSPCs. As adições analíticas de RF foram empregadas nas concentrações finais de 0,25; 0,5; 1,0 mg L^{-1} .

Tabela 10 - Teste de recuperação para a RF nas amostras de suplementos vitamínicos e minerais ($n = 3$).

Valores adicionados (mg L^{-1})		0,25	0,50	1,0
Recuperação (%) \pm DP ^a	Amostra 1	98,2 \pm 1,1	98,3 \pm 0,9	100,0 \pm 0,5
	Amostra 2	99,1 \pm 0,2	99,3 \pm 0,2	96,3 \pm 1,3
	Amostra 3	101,4 \pm 1,1	96,0 \pm 0,4	98,8 \pm 1,1

Onde, **a** é o desvio padrão.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 10, pode-se observar que os valores das recuperações para as amostras, após a adição dos padrões de RF, variaram entre 96 e 101,4% ($n = 3$). Esse intervalo de recuperação pode ser considerado satisfatório para a determinação do analito de interesse.

4.3 Determinação de RF em cervejas e vinhos pelo método automático

4.3.1 Estudo da vazão nos canais

As vazões médias que apresentaram resultados mais reprodutíveis foram encontradas para os canais individuais das soluções empregadas durante a determinação de riboflavina em cervejas e vinhos são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Vazões médias dos canais individuais das soluções.

Válvula	Solução	Vazão (mL s^{-1})
V1	Água	$0,0997 \pm 0,0037$
V2	NSPCs/tampão	$0,0995 \pm 0,0007$
V3	Padrões Riboflavina	$0,1040 \pm 0,0008$
V4	Amostras	$0,1113 \pm 0,0019$
V5	Descarte	$0,1017 \pm 0,0008$

Os resultados obtidos sugerem que o sistema automático dispõe de precisão satisfatória para o método proposto.

4.3.2 Obtenção e validação da curva analítica

Na Figura 41, pode ser visto que os espectros de emissão de fluorescência dos NSPCs obtidos pelo FBA, apresentam uma inibição de fluorescência provocada pela presença da RF, em tampão fosfato (pH 6,9). A intensidade de emissão da fluorescência, em 440 nm, diminui gradualmente com o aumento da concentração de RF.

Para a curva analítica feita a partir do método automático, a excitação se dá em 380 nm, e foi explorado o mesmo efeito de diminuição da intensidade de emissão dos NSPCs a 440 nm (efeito de FRET, discutido anteriormente), conforme se aumenta a concentração de RF (Kundu et al., 2013; Kundu et al., 2016; Wang et al., 2015a; Sapsford, Berti, Medintz, 2006).

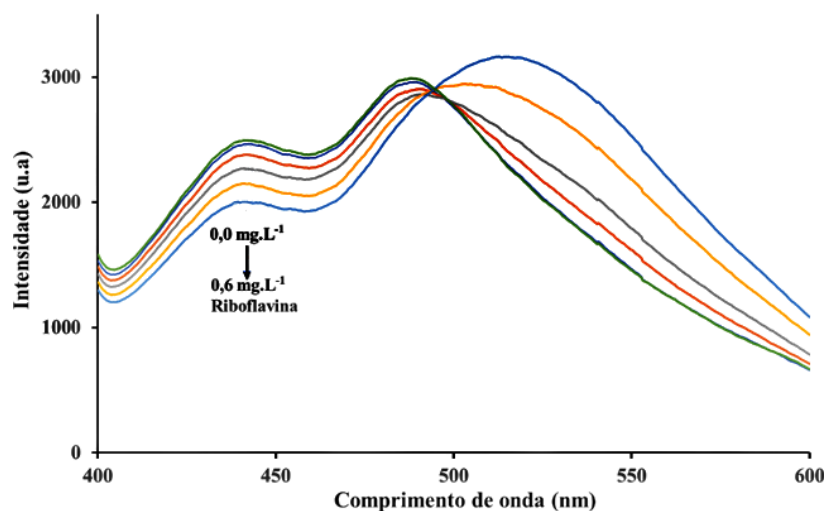


Figura 41 - Espectros de fluorescência dos NSPCs excitados em 380nm, obtidos a partir do sistema FBA proposto, em presença de soluções de RF de concentrações variadas (0,0 a 0,6 mg L⁻¹). Destacando-se a diminuição da intensidade de fluorescência do nanomaterial (440 nm), com o aumento da concentração da RF.

A curva analítica foi construída para a faixa de concentrações de 0,01 a 0,6 mg L⁻¹ dos padrões de RF, a partir dos espectros de fluorescência obtidos pelo método automático proposto baseado em NSPCs. Utilizou-se a relação de eficiência de FRET (EFRET%) já estabelecida na literatura (Wang et al., 2015a; Kundu et al., 2016) na construção da curva.

A Figura 42 mostra a curva analítica obtida a partir da utilização do método automático proposto para determinação de RF em vinhos e cervejas, através de medidas de eficiência de FRET (EFRET%) para diferentes concentrações da vitamina.

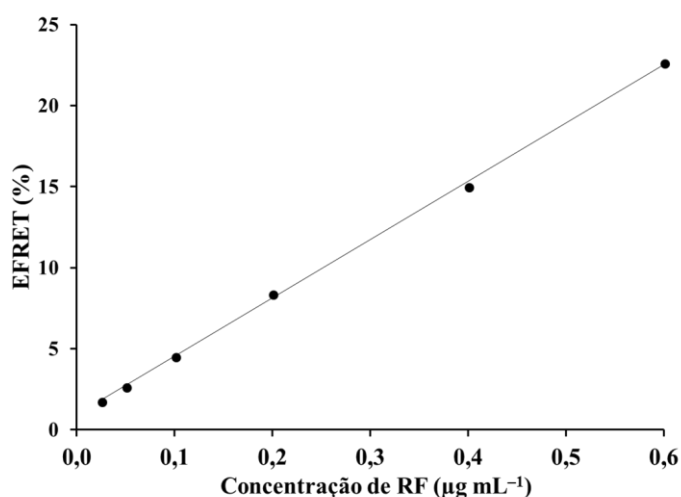


Figura 42 - Curva analítica EFRET (%) dos NSPCs *versus* concentração, para a determinação de RF em vinhos e cervejas (pH 6,9).

A curva foi construída a partir dos níveis de concentração 0,01; 0,025; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60 mg L⁻¹ de RF. Na Figura 42 pode ser visto o comportamento linear entre o valor da relação

de fluorescência e a concentração de RF das soluções padrão. Essa inferência baseada, inicialmente, pela equação da curva de calibração, $y = 36,009x + 0,9353$, obtida segundo o método dos mínimos quadrados, com um coeficiente de correlação de 0,9995, pode ser confirmada pela análise do gráfico dos resíduos deixado pelo modelo, apresentado na Figura 43, e corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida. Pode-se observar na Figura 43, os baixos valores e a distribuição aleatória dos resíduos ao longo da faixa de concentração estudada. Não se observa nenhum perfil, estrutura ou tendência sistemática que possa evidenciar alguma possível falta de ajuste do modelo construído para o método proposto.

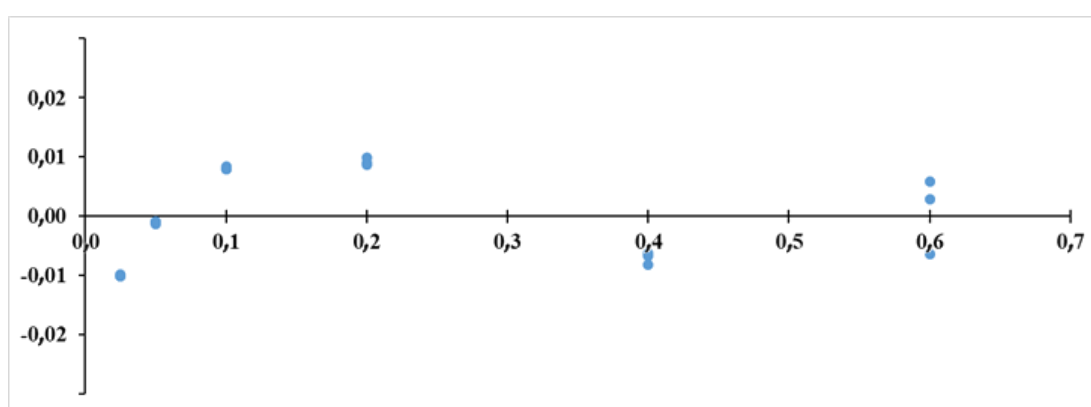


Figura 43 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.

Os resultados da aplicação da ANOVA, empregados para corroborar na validação do modelo de calibração, utilizando o método automático, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão (R)	$1,01 \times 10^3$	1	$1,01 \times 10^3$	Significância de R
Resíduos (r)	2,48	16	$1,55 \times 10^{-1}$	$\mathbf{MQ_R/MQ_r} = 6,51 \times 10^3$
Falta de ajuste (faj)	2,27	4	$1,75 \times 10^{-1}$	Falta de ajuste
Erro puro (ep)	0,21	12	$7,14 \times 10^{-2}$	$\mathbf{MQ_{faj}/MQ_{ep}} = 2,45$

Para verificar se o modelo postulado não apresenta falta de ajuste, compara-se o valor da relação MQ_{faj}/MQ_{ep} com o valor de $F_{4,12}$ (ponto de distribuição F para 4 e 12 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%, que é igual a 3,26. Como o valor obtido pela razão MQ_{faj}/MQ_{ep} para o modelo proposto é menor que o valor de $F_{4,12}$ tabelado, então não existe evidência de

falta de ajuste do modelo proposto. Para avaliar a significância estatística da regressão compara-se o valor da razão MQ_R/MQ_r com o valor de distribuição $F_{1,16}$ (igual a 4,49). Conclui-se que há significância na regressão.

4.3.3 Análise das amostras de vinhos e cervejas por adição de padrão

De acordo com o exposto, o método pode ser considerado adequado para a determinação da concentração de RF em amostras de vinhos e cervejas, no entanto, como se tratam de matrizes complexas, utilizou-se a técnica da adição de padrão para se contornar possíveis efeitos de matriz (Bonamore et al., 2016).

Pode ser observado na Figura 44, as curvas sobrepostas de adição de padrão para uma amostra de cerveja e uma de vinho, onde se pode notar a maior inclinação de RF para a mostra de vinho.

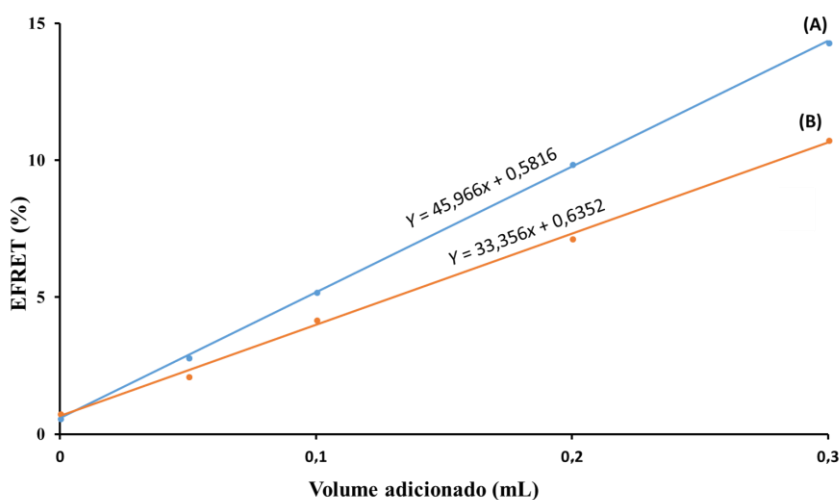


Figura 44 - Curvas de adição de padrão para uma amostra de vinho (a) e uma de cerveja (b), com EFRET(%) dos NSPCs *versus* volume de adição de solução padrão de RF, utilizadas na determinação automática de RF.

A diferença entre as sensibilidades analíticas nas curvas para o vinho (Figura 44A) e para a cerveja (Figura 44b) é devida principalmente ao efeito de matriz causado pelos diferentes teores de etanol encontrados nestas bebidas. Como descrito na parte experimental (Tabela 4), o teor alcoólico dos vinhos varia entre 10 e 12 % ($v v^{-1}$) e o das cervejas varia entre 4,5 a 5,0 % ($v v^{-1}$).

Koziol e Knobloch (1965) realizaram um estudo sobre o efeito solvente sobre a fluorescência da RF e seus vitâmeros e foi observado um aumento na intensidade de

fluorescência em solução alcoólica desta vitamina em relação a soluções aquosas, o que pode ter como causa principal o aumento no efeito da polaridade da vitamina com o solvente, eis que a diminuição da polaridade do solvente causa um aumento na energia de ativação do estado excitado planar para um estado de transferência de carga intramolecular, aumentando assim o rendimento quântico de fluorescência (Oliveira et al., 2003).

Koziol e Knobloch (1965) constataram um aumento em cerca de 23 % da intensidade de emissão da RF (RF/EtOH) de concentração $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em solução alcoólica 95 % (v v⁻¹), em relação a uma solução de RF (RF/H₂O), de mesma concentração, em tampão fosfato de concentração $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) como pode ser visto no gráfico (Figura 45).

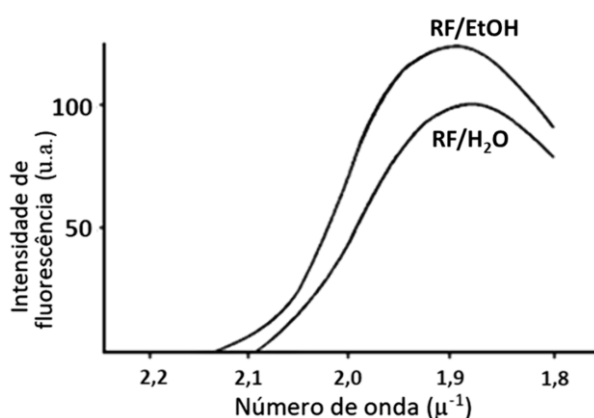


Figura 45 - Curvas emissão de soluções alcoólica a 95 % (v v⁻¹) (RF/EtOH) e aquosa em tampão fosfato de concentração $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), (RF/H₂O) de RF de mesma concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ evidenciando um aumento significativo na emissão quando se trata de solução. Adaptada de Koziol e Knobloch (1965).

Os resultados da análise do teor de RF em vinhos e cervejas obtidos pelo método automático são apresentados na Tabela 13 em comparação com o método de referência por HPLC ($\lambda_{\text{exc}} = 265 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emiss}} = 525 \text{ nm}$). Pode-se observar uma boa concordância entre os valores do método proposto e os de referência por HPLC. Quando aplicado o teste *t* pareado, os resultados não apresentaram diferenças significativas a um nível de 95% de confiança estatística.

Tabela 13 - Resultados obtidos da determinação da concentração de riboflavina em vinhos e cervejas usando o método proposto e o método de referência (n=3).

Amostra	Teor alcoólico % (v v ⁻¹) ^c	Método proposto (µg mL ⁻¹ ± DP ^a)	DPR% (método proposto)	Método de referência (µg mL ⁻¹ ± DP ^a)	DPR% (método de referência)	
cervejas	1	4,8	0,157 ± 0,003	2,1	0,159 ± 0,005	2,1
	2	4,5	0,164 ± 0,006	3,3	0,160 ± 0,005	3,2
	3	4,7	0,160 ± 0,004	2,3	0,159 ± 0,001	0,9
	4	4,9	0,133 ± 0,002	1,8	0,135 ± 0,002	1,5
vinhos	5	10,5	0,101 ± 0,002	1,5	0104 ± 0,004	3,5
	6	11,0	0,033 ± 0,001	2,6	0,034 ± 0,002	4,5
	7	11,5	0,039 ± 0,001	1,4	0,038 ± 0,001	2,6
	8	12,0	0,041 ± 0,001	2,0	0,039 ± 0,002	3,9

^a DP: desvio padrão.

^b DPR: desvio padrão relativo.

^c Informação contida no rótulo.

Os parâmetros do modelo obtido por regressão linear, para o método proposto, são apresentados na Tabela 14. Considerando que o modelo não apresentou falta de ajuste, descrevendo uma relação linear adequada entre o sinal analítico de fluorescência com a concentração de RF, com um coeficiente de correlação de 0,9979 na faixa de calibração, foram estimados os erros padrão dos coeficientes de regressão, b_0 e b_1 . Para isso, foi utilizado o valor da média quadrática residual (MQ_r) como estimativa da variância populacional dos erros aleatórios ao longo da regressão.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.

$y = b_0 + b_1 x$	
$b_0 \pm t S_{b_0}$	$b_1 \pm t S_{b_1}$
0,9353 \pm 0,0994	36,009 \pm 0,4472

A partir das estimativas e erros padrão de b_0 e b_1 , obteve-se o intervalo de 95% de confiança para os parâmetros populacionais (β_0 e β_1) do modelo. Os limites obtidos mostram que o valor

zero não está contido nos intervalos de confiança. Assim, ambos os coeficientes estimados para o modelo linear são estatisticamente significativos e devem ser mantidos na respectiva equação.

Após a validação da curva analítica, foram estimados para o método proposto, os valores dos limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e sensibilidade. Os valores estimados para essas características de desempenho são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Características de desempenho para o método proposto.

LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,004
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,013
Sensibilidade	36,009

Os valores de LOD, LOQ e sensibilidade estimados para o método fluorescente proposto revelaram ser satisfatórios, o que torna esse método apropriado para a determinação de RF em vinhos e cervejas.

Cuidados adicionais devem ser tomados quanto à estabilidade de soluções de RF, descritos na seção 3.7.7. já os NSPCs apresentaram uma estabilidade de fluorescência satisfatória conforme se apresenta no gráfico abaixo (Figura 46) referente ao estudo de estabilidade dos NSPCs produzidos neste trabalho.

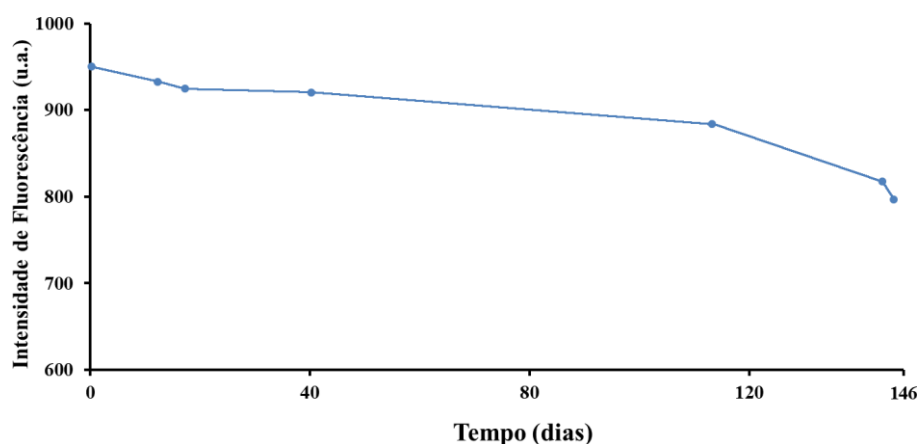


Figura 46 – gráfico da intensidade de fluorescência de dispersão dos NSPCs utilizados neste trabalho em função do tempo de armazenagem a uma temperatura de cerca de 4 °C e ao abrigo da luz.

Neste intervalo de tempo (146 dias) houve uma perda de cerca de 16 % na intensidade de fluorescência das nanopartículas. Diante deste resultado, as estabilidades óptica e química dos NSPCs foram consideradas satisfatórias para o tipo de análise proposta.

O método proposto apresentou uma frequência analítica de 20 minutos por amostra e 20 minutos para levantamento da curva analítica, o que foi considerado satisfatório para os objetivos do trabalho.

5

CONCLUSÃO

Neste trabalho de pesquisa foi desenvolvido um novo método fluorimétrico empregando pontos de carbono sintetizados a partir de biomassa disponível regionalmente. Para tanto foi utilizada satisfatoriamente uma estratégia de otimização das proporções dos bioprecusores. Explorou-se com êxito uma rota de síntese rápida, sem necessidade de tratamento adicional de aquecimento em forno de micro-ondas, resultando em um processo de baixo custo e ambientalmente amigável, eis que não foram produzidos resíduos tóxicos.

Os nanomateriais produzidos apresentaram alta emissão e estabilidade fotoquímica satisfatória. Foram ainda caracterizados por técnicas de espectrofotometria no UV-Vis, FT-IR, fluorescência, Kjeldahl, TEM e WD-XRF. Foram encontradas e aplicadas as condições químicas satisfatórias para utilização dos NSPCs na determinação de RF, explorando-se o mecanismo de FRET, constatado pelas características espectroscópicas do analito, dos NSPCs e por cálculos teórico-práticos aplicados ao sistema.

O sistema se mostrou pouco sensível a todos os interferentes estudados, indicando uma possível seletividade ao analito em questão. Testou-se o método de FRET com êxito de maneira convencional em comprimidos multivitamínicos e minerais obtendo-se resultados compatíveis com aqueles obtidos por método de referência.

Utilizou-se com êxito os componentes de um sistema FBA dedicado ao método proposto para a determinação de RF em bebidas fermentadas com o método de adição de padrão. O efeito de matriz das amostras pôde ser minimizado uma vez que o sistema FBA se mostrou adequado para metodologia proposta, através do gerenciamento do sistema automático de dispensação, mistura, descarte de fluidos e aquisição dos espectros de fluorescência, produzindo resultados compatíveis com aqueles encontrados pelo método de referência.

Com esta pesquisa, até onde se sabe, utilizou-se pela primeira vez com êxito uma mistura de produtos naturais com o claro propósito de se modelar PCs em síntese de etapa única em termos de funcionalizantes, obtendo-se resultados similares a nanopartículas produzidas com material sintético.

O trabalho contribui para o estado da arte no desenvolvimento de um novo método analítico automático, utilizando nanomateriais obtidos de bioprecusores de fácil aquisição.

5.1 Perspectivas

Aplicar o método proposto em outras matrizes como nutrimento animal, uma parcela importante no controle de qualidade aplicado é garantir ao consumidor final os níveis nutricionais constantes no rótulo do produto, e isso só é possível com um rígido controle e produção aliado a um programa de controle químico de qualidade envolvendo amostragens e determinações rotineiras e representativas, tanto das matérias primas quanto dos produtos acabados, e principalmente os produtos intermediários dentro do processo de produção de rações, que é a produção de premix (ou pré-misturas) vitamínicos.

Cabe ao pessoal da qualidade garantir que cada batelada foi produzida com a inserção de todos os ingredientes da fórmula e que também obedeceu aos requisitos físicos de produção. No dia a dia da fábrica de ração, a despeito de todos os controles que possam ser instituídos e aplicados, não é raro a pré-mistura deixar de ser incluída, ser incluída repetidamente ou simplesmente haver trocas de pré-misturas entre rações diferentes. Para minimizar esta possibilidade, uma análise rápida do teor de RF proporcionaria a garantia que o premix contendo aquela vitamina foi realmente inserido naquela produção.

Outra perspectiva que se pretende é a difusão dessa experiência no meio acadêmico, sugerindo atividades de pesquisa envolvendo as sínteses e determinações estabelecidas no trabalho e testando novas rotas e aplicações, envolvendo multidisciplinaridade tanto quanto possível.

REFERÊNCIAS

Abano E. E., Dadzie R. G., Simultaneous Detection of Water-Soluble Vitamins Using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) - a Review. *Croatian Journal of Food Science Technology*, 6, 2, 116-123, **2014**.

Ahmad I., Fasihullah Q., Noor A., Ansari I. A., Ali Q. N. M., Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *International Journal of Pharmaceutics* 280, 199–208, **2004**.

Ahmad I., Abbas S. H., Anwar Z., Sheraz M. A., Ahmed S., Arsalan A., Bano R., Stability-Indicating Photochemical Method for the Assay of Riboflavin: Lumichrome Method. *Journal of Chemistry*, 1-8, **2015**.

Ahmad I., Qadeer K., Iqbal K., Ahmed S., Sheraz M. A., Ali S. A., Mirza T., Hafeez A., Correction for Irrelevant Absorption in Multicomponent Spectrophotometric Assay of Riboflavin, Formylmethylflavin, and Degradation Products: Kinetic Applications. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 14, 3, 1101-1107, **2013**.

Ahmed G. H. G., Laíño R. B., Calzón J. A. G., García M. E. D., Highly Fluorescent Carbon Dots as Nanoprobes for Sensitive and Selective Determination of 4-Nitrophenol in Surface Waters. *Microchimica Acta*, 182, 1–2, 51–59, **2015**.

Alexandre T. L.; Bueno, M. I. M. S., Classification of Some Species, Genera and Families of Plants by X-ray Spectrometry. *X-Ray spectrometry*, v. 35, n.4, p. 257-260, **2006**.

Almeida A., Suyenaga E. S., Ação farmacológica do alho (*Allium sativum* L.) e da cebola (*Allium cepa* L.) sobre o sistema cardiovascular: revisão *Journal of Brazilian Society of Food and Nutrition*, 34, 1, 185-197, **2009**.

Amelinckx S., Dick V. D., Landuyt V. J., Tandeloo V. G., Handbook of Microscopy Applications in Materials Science, Solid-state Physics and Chemistry. *Methods* 2, v2., Weinheim, New York, 510p., **1997**.

An J., Bagnell L., Cablewski T., Strauss C. R., Trainor, R. W., Applications of High-Temperature Aqueous Media for Synthetic Organic Reactions. *Journal of Organic Chemistry*, 62, 8, 2505-2511, **1997**.

An X., Zhuo S., Zhang P., Zhu C., Carbon Dots Based turn-on Fluorescent Probes for Oxytetracycline Hydrochloride Sensing. *RSC Advances*, 26, 5, 19853-19858, **2015**.

Andrés-Lacueva C., Mattivi F., Tonon D., Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin-adenine dinucleotide in wine and other beverages by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823, 355–363, **1998**.

Aniceto C., Canaes L. S., Fatibello-Filho O., Cavaleiro C. C. S., Determinação Espectrofotométrica de Vitamina B₂ (Riboflavina) em Formulações Farmacêuticas Empregando Sistema de Análises por Injeção em Fluxo. *Química Nova*, 23, 5, 637-640, **2000**.

Anyakora C., Afolami I., Ehianeta T., Onwumere F., HPLC Analysis of Nicotinamide, Pyridoxine, Riboflavin and Thiamin in Some Selected Food Products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 2, 029-036, **2008**.

Arnold A., Lipsius S. T., Greene D. J., Riboflavin Determination by the Microbiological Method. *Journal of food science*, 6, 1, 39-43, **1941**.

Ashraf M., Javed S., Abbas Q., Khokhar M. Y., Nangyal H., Sherwani S. K., Kausar R., Spectrophotometric Determination of Riboflavin with Spermine-Copper Chloride Complexes in Pharmaceutical Preparations. *American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science*, 14, 12, 1397-1401, **2014**.

Baccaro A. L. B., Gutz I. G. R., Fotoeletrocatalise em Semicondutores: Dos Princípios Básicos até sua Conformação à Nanoescala. *Química Nova*, 41, 3, 326-339, **2018**.

Baker S. N., Baker G. A., Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 6726, **2010**.

Ball G. F. M., Bioavailability and analysis of vitamins in foods, 1ed. London: Chapman & Hall, 146 p. **1998**.

Bandi R., Gangapuram B. R., Dadigala R., Eslavath R., Singh S. S., Guttana V., Facile and Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Onion Waste and their Potential Applications as Sensor and Multicolour Imaging Agents. *RSC Advances*, 34, 6, 28633-28639, **2016**.

Bandžuchová L., Šelešovská R., Navrátil T., Chýlková J., Novotný L., Voltammetric Monitoring of Electrochemical Reduction of Riboflavin Using Silver Solid Amalgam Electrodes. *Electrochimica Acta*, 75, 316-324, **2012**.

Bankoti K., Rameshbabu A. P., Datta S., Das B., Mitra A., Dhara S., Onion Derived Carbon Nanodots for Live Cell Imaging and Accelerated Skin Wound Healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 32, 5, 6579-6592, **2017**.

Baptista F. R., Belhout S. A., Giordani S., Quinn S. J., Recent Developments in Carbon Nanomaterial Sensors. *Chemical Society Reviews*, 44, 4433-4453, **2015**.

Barakat M. Z., Badran N., A Photoelectric Colorimetric Method for the Estimation of Riboflavine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3, 3, 501-505, **1951**.

Barati A., Shamsipur M., Arkan E., Hosseinzadeh L., Abdollahi H., Synthesis of Biocompatible and Highly Photoluminescent Nitrogen Doped Carbon Dots From Lime: Analytical applications and optimization using response surface methodology. *Materials Science and Engineering C*, 47, 325-332, **2015**.

Barboza A. C. R. N., Cruz C. V. M. S., Graziani M. B., Lorenzetti M. C. F., Sabadini E., Aquecimento em Forno de Microondas / Desenvolvimento de Alguns Conceitos Fundamentais. *Química Nova*, 24, 6, 901-904, **2001**.

Baruah S., Dutta J., Nanotechnology Applications in Pollution Sensing and Degradation in Agriculture: A Review. *Environmental Chemistry Letters*, 7, 191–204, **2009**.

Basavaiah K., Tadesse A., RamaDevi D., Hagos M., Battu G., Facile Green Synthesis of Fluorescent Carbon Quantum Dots From Citrus Lemon Juice for Live Cell Imaging. *Asian Journal of Nanoscience and Materials*, 1, 32-42, **2018**.

Batista C. A. S., Larson R. G., Kotov N. A., Nonadditivity of Nanoparticle Interactions. *Science*, 350, 6257, 1242477-1 – 1242477-10, **2015**.

Beary E. S., Comparison of Microwave Drying and Conventional Drying Techniques for Reference Materials. *Analytical Chemistry*, 60, 8, 742-746, **1998**.

Berg T. M., Behagel H. A., Semiautomated Method for Microbiological Vitamin Assays. *Applied Microbiology*, 23, 3, 531-542, **1972**.

Berger M. M., Shenkin A., Path F. R. C., Vitamins and Trace Elements: Practical Aspects of Supplementation. *Nutrition*, 22, 9, 952-955, **2006**.

Bianchini-Pantuschka R., Penteado M. V. C., Vitamina B6. In: Penteado M. V. C., Vitaminas: Aspectos Nutricionais, Bioquímicos, Clínicos e Analíticos. Barueri, SP: Manole, 612p, **2003**.

Bobbio F., Bobbio P., Introdução à Química de Alimentos, 2ed. São Paulo; Varela, 223p, **1989**.

- Bonamora A., Gargano M., Calisti L., Francioso A., Mosca L., Boffi A., Frederico R.,** A Novel Direct Method for Determination of Riboflavin in Alcoholic Fermented Beverages. *Food Analytical Methods*, 9, 840-844, **2016**.
- Borse V., Thakur M., Sengupta S., Srivastava R.,** N-Doped Multi-Fluorescent Carbon Dots for 'Turn Off-On' Silver-Biothiol dual Sensing and Mammalian Cell Imaging Application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 248, 481-492, **2017**.
- Bourlinos A. B., Stassinopoulos A., Anglos D., Zboril R., Karakassides M., Giannelis E. P.,** Surface Functionalized Carbogenic Quantum Dots. *Small*, 4, 4, 455-458, **2008a**.
- Bourlinos A. B., Stassinopoulos A., Anglos D., Zboril R., Georgakilas V., Giannelis E. P.,** Photoluminescent Carbogenic Dots. *Chemistry of Materials*, 20, 14, 4539-4541, **2008b**.
- Brasil**, Portaria nº. 8, de 17 de janeiro de 2014. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, seção 1, p.13., 22 jan., **2014**.
- Bragg W. L.,** The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by Crystal. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 18, 1, 43-57, **1912**.
- Brezo T., Stojanović Z., Suturović Z., Kravić S., Kos J., Đurović A.,** Simple, Rapid and Selective Chronopotentiometric Method for the Determination of Riboflavin in Pharmaceutical Preparations Using a Glassy Carbon Electrode. *Acta Chimica Slovenica*, 62, 923-931, **2015**.
- Brouwer A. M.,** Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution. *Pure and Applied Chemistry*, 83, 2213-2228, **2011**.
- Buiatti S.,** Beer Composition: An Overview. *Beer in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 20, 213-225, **2009**.
- Burdock G. A.,** Encyclopedia of Food and Color Additives, Boca Raton, FL, CRC Press. 1-3, **1997**.
- Caballero I., Blanco C.A., Porras M.,** Iso- α -Acids, Bitterness and Loss of Beer Quality During Storage. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 21-30, **2012**.
- Çakir S., Atayman I., Çakir O.,** Simultaneous Square-wave Voltammetric Determination of Riboflavin and Folic Acid in Pharmaceutical Preparations, *Mikrochimica Acta*, 126, 237-240, **1996**.
- Cayuela A., Soriano M. L., Carrillo-Carrión C., Valcárcel M.,** Semiconductor and Carbon-Based Fluorescent Nanodots: the Need for Consistency. *Chemical Communication*, 52, 7, 1311-1326, **2016**.
- Chandra S., Patra P., Pathan S. H., Roy S., Mitra S., Layek A., Bhar R., Pramanik P., Goswami A.,** Luminescent S-doped carbon dots: an emergente architecture for multimodal applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 2375-2382, **2013**.
- Chen Y., Wu Y., Weng B., Wang B., Li C.,** Facile Synthesis of Nitrogen and Sulfur co-Doped Carbon Dots and Application For Fe(III) Ions Detection and Cell Imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 223, 689-696, **2016**.
- Choe E., Huang R., Min D. B.,** Chemical Reactions and Stability of Riboflavin in Foods. *Journal of Food Science*, 70, 1, **2005**.
- Clark B. J., Fell A. F., Milne K. T., Pattie D. M. G., Williams M. H.,** Pharmaceutical Applications of Variable-Angle Synchronous Scanning Fluopescence Spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 170, 35-44, **1985**.
- Clegg R. M.,** Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, 6:103-110, **1995**.

Combs G. F. J., The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health. Academic Press 3ed., 598p, San Diego, Academic Press, **2012**.

Costas-Mora I., Romero V., Lavilla I., Bendicho C., An Overview of Recent Advances in the Application of Quantum Dots as Luminescent Probes to Inorganic-Trace Analysis. Trends in Analytical Chemistry, 57, 64-72, **2014**.

Criss J. W., Birks L. S., Calculation Methods for fluorescent x-ray spectrometry. Analytical Chemistry, 40, 1080-1086, **1968**.

Danilenko V. V., On the History of the Discovery of Nanodiamond Synthesis. Physics of the Solid State, 46, 4, 595–599, **2004**.

De B., Karak N., A Green and Facile Approach for the Synthesis of Water Soluble Fluorescent Carbon Dots from Banana Juice. RSC Advances, 22, 3, 8286-8290, **2013**.

Depeint F., Bruce W. R., Shangari N., Mehta R., P., O'Brien P. J., Mitochondrial Function and Toxicity: Role of B Vitamins on The One-Carbon Transfer Pathways. Chemico-Biological Interactions, 27, 163, 1-2, 113-132, **2006**.

Díez-Pascual A. M., Garcia-Garcia D., Andrés M. P. S., Vera S., Determination of Riboflavin based on Fluorescence Quenching by Graphene Dispersions in Polyethyleneglycol. RSC Advances, 6, 19686-19699, **2016**.

Dimos K., Carbon Quantum Dots: Surface Passivation and Functionalization. Current Organic Chemistry, 20, 6, 682-695, **2016**.

Ding H., Ji Y., Wei J., Gao Q., Zhou Z., Xiong H., Facile Synthesis of Red-Emitting Carbon Dots from Pulp-Free Lemon Juice for Bioimaging. Journal of Materials Chemistry B, 26, 5, 5272-5277, **2017**.

Ding L., Yang H., Ge S., Yu J., Fluorescent Carbon Dots Nanosensor for Label-free Determination of Vitamin B₁₂ based on Inner Filter Effect. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 193, 305-309, **2018**.

Diniz P. H. G. D., Almeida L. F., Harding D. P., Araújo M. C. U., Flow-Batch Analysis. Trends in Analytical Chemistry, 35, 39-49, **2012**.

Dolai S., Bhunia S. K., Jelinek R., Chemical Carbon-Dot-Aerogel Sensor for Aromatic Volatile Organic Compounds. Sensors and Actuators B, 241, 607–613, **2017**.

Du F., Zeng F., Ming Y., Wu S., Carbon Dots-Based Fluorescent Probes for Sensitive and Selective Detection of Iodide. Microchimica Acta, 180, 453-460, **2013**.

Duan J., Yu J., Feng S., Su L., A Rapid Microwave Synthesis of Nitrogen–Sulfur Co-Doped Carbon Nanodots as Highly Sensitive and Selective Fluorescence Probes For Ascorbic Acid. Talanta, 153, 332-339, **2016**.

Durán N., Simões M. B., Moraes A. C. M., Fávoro W. J., Seabra A. B., Nanobiotechnology of Carbon Dots: A Review. Journal of Biomedical Nanotechnology, 12, 1323–1347, **2016**.

Eda G., Lin Y., Mattevi C., Yamaguchi H., Chen H., Chen I., Chen C., Chhowalla M., Blue Photoluminescence from Chemically Derived Graphene Oxide. Advanced Materials, 22, 505–509, **2010**.

Edison T. N. J. I., Atchudan R., Shim R., Kalimuthu S., Ahn B., Lee Y. R., Turn-off fluorescence sensor for the detection of ferric ion in water using green synthesized N-doped carbon dots and its bio-imaging. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 158, 235-242, **2016**.

Edmondson D., Ghisla S., Flavoenzyme Structure and Function. Approaches Using Flavin Analogues. *Methods in molecular biology*, 131, 157-159, **1999**.

Edwards S. J., Musker D., Collin H. A., Britton G., The Analysis of S-alk(en)yl-L-cysteine Sulphoxides (Flavour Precursors) from Species of *Allium* by High Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 5, 4-9, **1994**.

Eitenmiller R. R., Landen, W. O. J., Riboflavin. Em: *Modern Analytical Methodologies in Fat-and Water-Soluble Vitamins*, New York: John Wiley & Sons 154, 253-289, **2000**.

Essner J. B., Baker G. A., The emerging roles of carbon dots in solar photovoltaics: a critical review. *Environmental Science: Nano*, 4, 6, 1216-1263, **2017**.

Ewing G. W., Métodos Instrumentais de Análise Química. São Paulo, Edgard Blücher Editora, 296 p., **1972**.

Facchin I., Extração líquido-líquido em sistema de fluxo monossegmentado. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, **1996**.

Fan Z., Li Y., Li X., Fan L., Zhou S., Fang D., Yang S., Surrounding Media Sensitive Photoluminescence of Boron-Doped Graphene Quantum Dots for Highly Fluorescent Dyed Crystals, *Chemical Sensing and Bioimaging*. *Carbon*, 70, 149-156, **2014**.

Fanslow G. E., Microwave Enhancement of Chemical and Physical Reactions. *Materials Research Society*, 189, 43-48, **1990**.

Fishman S. M., Christian P., West K. P. J., The Role of Vitamins in the Prevention and Control of Anaemia. *Public Health Nutrition*, 3, 2, 125-150, **2000**.

Flore D., Bruce W. R., Shangari N., Mehta R., O'Brien P. J., Mitochondrial Function and Toxicity: Role of The B Vitamin Family on Mitochondrial Energy Metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 163 (1-2), 94-112, **2006**.

Fong J. F. Y., Chin S. F., Ng S. M., A Unique “Turn-On” Fluorescence Signalling Strategy for Highly Specific Detection of Ascorbic Acid Using Carbon Dots as Sensing Probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 844-852, **2016**.

Förster T., Intermolecular Energy Migration and Fluorescence. In: *Mielczarek E. V. Biological Physics*. New York: American Institute of Physics, 148-160, **1993**.

Freestone I., Meeks N., Sax, M., Higgitt, C., The Lycurgus Cup – A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin*, 4, 40, **2007**.

Gaetano G., Costanzo S., Castelnovo A., Badimon L., Bejko D., Alkerwi A., Chiva-Blanch G., Estruch R., Vecchia C., Panico S., Pounis G., Sofi F., Stranges S., Trevisan M., Ursini F., Cerletti C., Donati M. B., Iacoviello L., Effects of Moderate Beer Consumption on Health and Disease: A Consensus Document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26, 6, 443-67, **2016**.

Galdón B. R. G., Rodríguez C. T., Rodríguez E. R., Romero C. D., Organic Acid Contents in Onion Cultivars (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6512-6519, **2008**.

García L., Blázquez S., San Andrés M. P., Vera S., Determination of Thiamine, Riboflavin and Pyridoxine in Pharmaceuticals by Synchronous Fluorescence Spectrometry in Organized Media. *Analytica Chimica Acta*, 434, 193-199, **2001**.

- Garg D., Mehta A., Mishra A., Basu S.,** A Sensitive turn on Fluorescent Probe for Detection of Biothiols using MnO₂@Carbon Dots Nanocomposites. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 192, 411-419, **2018**.
- Ge J., Jia Q., Liu W., Guo L., Liu Q., Lan M., Zhang H., Meng X., Wang P.,** Red-Emissive Carbon Dots for Fluorescent, Photoacoustic, and Thermal Theranostics in Living Mice. *Advanced Materials*, 27, 4168-4177, **2015**.
- Gedye R., Smith F., Westaway K., Ali H., Baldisera L.; Laberge L.; Rousell, J.,** The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters*, 27, 3, 279-282, **1986**.
- Geim A. K., Novoselov K. S.,** The Rise of Graphene. *Nature Materials*, 6, 183-191, **2004**.
- George J., Bhowmick A. K.,** Ethylene Vinyl Acetate/Expanded Graphite Nanocomposites by Solution Intercalation: Preparation, Characterization and Properties. *Journal of Materials Science* 43, 2, 702-708, **2008**.
- Giguere R. J., Bray T. L., Duncan S. M., Majetich G.,** Application of Commercial Microwave Ovens to Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters*, 27, 41, 4945-4948, **1986**.
- Gogoi S., Karak N.,** Solar-Driven Hydrogen Peroxide Production Using Polymer-Supported Carbon Dots as Heterogeneous Catalyst. *Nano-Micro Letters*, 9, 40, 1-11, **2017**.
- Golbach J. L., Ricke S. C., O'Bryan C. A., Grandall P. G.,** Riboflavin in Nutrition, Food Processing, and Analysis - A Review. *Journal of Food Research*, 3, 6, **2014**.
- Gonçalves, H., Silva, E. J. C. G.,** Fluorescent Carbon Dots Capped with PEG200 and Mercaptosuccinic Acid. *Journal of Fluorescence*, 20, 5, 1023-1028, **2010**.
- Gong J., Lu X., An X.,** Carbon Dots as Fluorescent Off-On Nanosensors for Ascorbic Acid Detection. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5, 8533-8536, **2015**.
- Goodhew P. J., Humphreys J., Beanland R.,** *Electron Microscopy and Analysis*, 3ed., Taylor & Francis, New York, **2001**.
- Gorinstein S., Zemser M., Lichman I., Berebi A., Kleipfish A., Libman I., Trakhtenberg S., Caspi A.,** Moderate Beer Consumption and the Blood Coagulation in Patients With Coronary Artery Disease. *Journal of Internal Medicine*, 241, 47-51, **1997**.
- Grünhut M., Martins V. L., Centurión M. E., Araújo M. C. U., Band B. S. F.,** Flow-Batch Analyzer for the Chemiluminescence Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Preparations. *Analytical Letters*, 44, 67-81, **2011**.
- Guo L., Ge J., Liu W., Niu G., Jia Q., Wang H., Wang P.,** Tunable Multicolor Carbon Dots Prepared from Well-Defined Polythiophene Derivatives and their Emission Mechanism. *Nanoscale* 8, 2, 729-734, **2016**.
- Hainfellner C., Zagolin G.,** *Vitaminas*. *Food Ingredients Brasil*, 29, 58-88, **2014**.
- Hardman R.,** A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environmental Health Perspective*, 114, 2, 165-172, **2006**.
- Harris, Daniel C.,** *Análise Química Quantitativa*, 6 ed., LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro - RJ, **2005**.
- Hashizume T.,** Fundamentos de tecnologia do vinho. In: Aquarone, E.; Lima, U. A.; Borzani W., *Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. São Paulo, SP, Edgard Blücher, **1983**.

Hashmi M. H., Ajmal A. I. Qureshi T., Rashid A., Spectrophotometric Determination of Riboflavin from Pharmaceutical Preparations. *Mikrochimica Acta*, 30-35, **1969**.

He G., Shu M., Yang Z., Ma Y., Huang D., Xu S., Wang Y., Hu N., Zhang Y., Xu L., Microwave Formation and Photoluminescence Mechanisms of Multi-States Nitrogen Doped Carbon Dots. *Applied Surface Science*, 422, 257-265, **2017**.

Herbst, M. H.; Macêdo, M. I. F.; Rocco, A. M., Tecnologia dos Nanotubos de Carbono: Tendências e Perspectivas de Uma Área Multidisciplinar. *Química Nova*, 27, 986-992, **2004**.

Himaja A.L., Karthik P.S., Singh S.P., Carbon Dots: the Newest Member of the Carbon Nanomaterials Family. *Chemical Record* 15, 595-615, **2015**.

Hoan B. T., Huan P. V., Van H. N., Nguyen D. H., Tam P. D., Nguyen K. T., Pham V. H., Luminescence of Lemon-Derived Carbon Quantum Dot and its Potential Application in Luminescent Probe for Detection of Mo⁶⁺ ions. *Luminescence*, 1-7, **2018**.

Hohne B. A., Pierce T. H., Expert System Applications in Chemistry. ACS Symposium Series. Washington DC: American Chemical Society, **1989**.

Hola K., Zhang Y., Wang Y., Giannelis E. P., Zboril R., Rogach A. L., Carbon dots—Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. *Nano Today*

9, 5, 590-603, **2014**.

Honorato R. S., Araújo M. C. U., Lima R. A. C., Zagatto E. A. G., Lapa R. A. S., Lima J. L. F. C., A Flow-Batch Titrator Exploiting a One-Dimensional Optimisation Algorithm for End Point Search. *Analytica Chimica Acta*, 396, 1, 91-97, **1999**.

Hou J., Dong J., Zhu H., Teng X., Ai S., Mang M., A Simple and Sensitive Fluorescent Sensor for Methyl Parathion Based on L-Tyrosine Methyl Ester Functionalized Carbon Dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 15, 20-26, **2014**.

Hovius M. H. Y., Goldman I. L., Parkin K. L., Flavor Precursor [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide] Concentration and Composition in Onion Plant Organs and Predictability of Field White Rot Reaction of Onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 2, 196-202, **2005**.

Hsu P., Shih Z.Y., Lee C.H., Chang H., Synthesis and Analytical Applications of Photoluminescent Carbon Nanodots. *Green Chemistry*. 14, 917-920, **2012**.

Hu B., Wang K., Wu L., Yu S. H., Antonietti M., Titirici M. M., Engineering Carbon Materials from the Hydrothermal Carbonization Process of Biomass. *Advanced Materials*, 22, 7, 813-828, **2010**.

Hui Y., Xiao X., Zhao X., Hu L., Lv C., Yin Z., Study on Fluorescence Spectra of Thiamine, Riboflavin and Pyridoxine, SPIE, Advances in Engineering Research, Proceedings of the Seventh International Symposium on Precision Mechanical Measurements, 9903, 1-10, **2016**.

Hu L., Yang X., Wang C., Yuan H., Xiao D., Determination of Riboflavin in Urine and Beverages by Capillary Electrophoresis With In-Column Optical Fiber Laser-Induced Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 856, 245–251, **2007**.

Hu S., Niu K., Sun J., Yang J., Zhao N., Du X., One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation. *Journal of Materials Chemistry*, 4, 19, 484-488, **2009**.

Hu S., Wang Y., Zhang W., Chang Q., Yang J., Multicolour Emission States from Charge Transfer between Carbon Dots and Surface Molecules. *Materials*, 10, 2, 165, 1-9, **2017**.

Huang H., Lv J., Zhou D., Bao N., Xu Y., Wang A., Feng J. J., One-Pot Green Synthesis of Nitrogen-Doped Carbon Nanoparticles as Fluorescent Probes for Mercury ions. *RSC Advances*, 44, 3, 21691-21696, **2013**.

Huang T., Crews J. B., Nanotechnology Applications in Viscoelastic Surfactant Stimulation Fluids. *Petroleum Engineers Production & Operations*, 23, 04, 512-517, **2008**.

Hucker B., Wakeling L., Vriesekoop F., The Quantitative Analysis of Thiamin and Riboflavin and Their Respective Vitamers in Fermented Alcoholic Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12278-12285, **2011**.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ), Métodos Físico-Químicos Para Análise de Alimentos. 4ed. São Paulo: IAL, **2008**.

Iijima, S., Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature*, 354, 6348, 56-58, **1991**.

Indyk, H.E., Woollard D.C., Determination of vitamin K in Milk And Infant Formulas by Liquid Chromatography: Collaborative Study. *Journal AOAC. International*, 83, 121–130, **2000**.

Imai S., Tsuge N., Tomotake M., Nagatome Y., Sawada H., Nagata T., Kumagai H., Plant biochemistry: An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature* - 419:685-685, **2002**.

Insel P., Ross D., McMahon K., Bernstein M., Water Soluble Vitamins. Em: *Nutrition* – 4ed. 429 – 466. Jones and Bartlett Publishers, Burlington, MA, USA, **2007**.

Jaiswal A., Ghosh S. S., Chattopadhyay A., One Step Synthesis of C-Dots by Microwave Mediated Caramelization of Poly(ethyleneglycol). *Chemical Communications*, 3, 48, 407-409, **2012**.

Jayan, P. M., Nanotubes from Carbon. *Chemical Reviews*, 99, 1787-1800, **1999**.

Jelinek R., Ben-Gurion, Sheva B., Carbon Quantum Dots, Synthesis, Properties and Applications. Springer, Switzerland, 130p., **2017**.

Jenkins R., Gould R. W., Gedcke D., Quantitative X-ray Spectrometry. Marcel Dekker, 2ed. New York, 588 p., **1981**.

Jenkins R., X-Ray Fluorescence Spectrometry. 2ed., New York: Wiley, **1999**.

Jiang K., Sun S., Zhang L., Lu Y., Wu A., Cai C., Lin H., Red, Green, and Blue Luminescence by Carbon Dots: Full-Color Emission Tuning and Multicolor Cellular Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 5360-5363, **2015**.

Jin P., Xia L., Li Z., Che N., Zou D., Hu X., Rapid Determination Of Thiamine, Riboflavin, Niacinamide, Pantothenic Acid, Pyridoxine, Folic Acid and Ascorbic Acid in Vitamins With Minerals Tablets by High-Performance Liquid Chromatography With Diode Array Detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 151-157, **2012**.

Kakitani A., Inoue T., Matsumoto K., Watanabe J., Nagatomi Y., Mochizuki N., Simultaneous determination of water-soluble vitamins in beverages and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31,12, 1939-1948, **2014**.

Katsanos A. A., X-Ray Methods. In: IAEA, ed. - Elemental Analysis of Biological Materials. Viena, IAEA, Technical Reports series no. 197, p. 231, **1980**.

Kaur G., Singh T., Kumar A., Nanotechnology: A Review. International Journal of Education and Applied Research, 2, 1, 50-53, **2012**.

Kellner R., Mermet J., Otto M., Varcárcel M., Widmer H. M. (Editores), Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science, 2ed. Weinheim: Wiley – VCH, **2004**.

Keukelerie D. D., Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. Química Nova, 23, 108-112, **2000**.

Kimball S. M., Emery J. C. H., Lewanczuk R. Z., Effect of a Vitamin and Mineral Supplementation on Glycemic Status: Results From a Community-Based Program, Journal of Clinical & Translational Endocrinology, 10, 28–35, **2017**.

King J. M., Min D. B., Riboflavin photosensitized singlet oxygen oxidation of vitamin D. Journal of Food Science, 63, 31-34, **1998**.

Kolev S. D.; Mckelvie I. D., (Editores), Comprehensive Analytical Chemistry. Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 783 p. **2008**.

Kornb M. G. A., Zanonc M. V. B., Nascentes C. C., Química Analítica no Brasil: Atualidades, Tendências e Desafios. Química Nova, 40, 6, 643-649, **2017**.

Kornienko N., Sakimoto K. K., Herlihy D. M., Nguyen S. C., Alivisatos A. P., Harris C. B., Schwartzberg A., Yang P., Spectroscopic Elucidation of Energy Transfer in Hybrid Inorganic–Biological Organisms for Solar-To-Chemical Production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113, 42, 11750–11755, **2016**.

Koziol J., Knobloch E., The Solvent Effect on the Fluorescence and Light Absorption on Riboflavin and Lumiflavin. Biochimica et Biophysica Acta, 102, 289-300, **1965**.

Krishnamoorthy K., Veerapandian M., Mohan R., Kim S., Investigation of Raman and photoluminescence studies of reduced graphene oxide sheets. Applied Physics A: Mater Science and Processing, 106, 3, 501–506, **2012**.

Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S. C., Curl R. F., Smalley R. E., C-60: Buckminsterfullerene. Nature, 318, 6042, 162-163, **1985**.

Kubitscheck U., Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications. WILEY-BLACKWELL, 410, **2013**.

Kundu A., Nandi S., Layek R. K., Nandi A. K., Fluorescence Resonance Energy Transfer from Sulfonated Graphene to Riboflavin: A Simple Way to Detect Vitamin B₂. ACS Applied Materials & Interfaces, 5, 15, 7392-7399, **2013**.

Kundu A., Nandi S., Das P., Nandi A. K., Facile and Green Approach to Prepare Fluorescent Carbon Dots: Emergent Nanomaterial for Cell Imaging and Detection of Vitamin B₂. Journal of Colloid and Interface Science, 468, 276-283, **2016**.

Lamble K. J., Hill S. J., Microwave Digestion Procedures for Environmental Matrices. Analyst, 123, 103R–133R, **1998**.

- Lan M., Zhang J., Chui Y., Wang H., Yang Q., Zhu X., Wei H., Liu W., Ge J., Wang P., Chen X., Lee C., Zhang W.,** A Recyclable Carbon Nanoparticle-Based Fluorescent Probe for Highly Selective and Sensitive Detection of Mercapto Biomolecules. *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 127-134, **2015**.
- Landy M., Dicken D. M.,** A Microbiological Assay Method for Six B Vitamins using *Lactobacillus casei* and A Medium of Essentially Known Composition. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 27, 1086-1092, **1942**.
- LeCroy G. E., Sonkar S. K., Yang F., Veca L. M., Wang P., Tackett K. N., Yu J., Vasile E., Qian H., Liu Y., Luo P. G., Sun Y.,** Toward Structurally Defined Carbon Dots as Ultracompact Fluorescent Probes. *ACS Nano*, 8, 5, 4522–4529, **2014**.
- Lee E., Corfe B. M., Powers H. J.,** Riboflavin depletion of intestinal cells in vitro leads to impaired energy generation and enhanced oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, 52, 1513–1521, **2013**.
- Lee K., Park E., Lee H. A., Sugnaux C., Shin M., Jeong C. J., Lee J., Messersmith P. B., Park S. Y., Lee H.,** Phenolic Condensation and Facilitation of Fluorescent Carbon Dot Formation: A Mechanism Study. *Nanoscale*, 9, 16596-16601, **2017**.
- Lehninger A. L.,** *Princípios de bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 185-204, 538-563, **1993**.
- Lei Z., Chen B., Koo Y., MacFarlane D. R.,** Introduction: Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 117, 10, 6633-6635, **2017**.
- Li L., Dong T.,** Photoluminescence Tuning in Carbon Dots: Surface Passivation or/and Functionalization, Heteroatom Doping. *Journal of Materials Chemistry C*, 6, 7944-7970, **2018**.
- Li H., He X., Kang Z., Huang H., Liu Y., Liu J., Lian S., Tsang C.H.A., Yang X., Lee S.,** Water-soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 4430-4434, **2010**.
- Li H., He X., Liu Y., Huang H., Lian S., Lee S., Kang Z.,** One-Step Ultrasonic Synthesis of Water-Soluble Carbon Nanoparticles with Excellent Photoluminescent Properties. *Carbon*, 49, 605-609, **2011**.
- Li H., Kang Z., Liu Y., Lee S. T.,** Carbon Nanodots: Synthesis, Properties and Applications. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 24230-24253, **2012**.
- Li L., Lu C., Li S., Liu S., Wang L., Cai W., Xu W., Yang X., Liu Y., Zhang R.,** A high-yield and versatile method for the synthesis of carbon dots for bioimaging applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 1935-1942, **2017**.
- Li Q., Ohulchanskyy T.Y., Liu R., Koynov K., Wu D., Best A., Kumar R., Bonoiu A., Prasad P.N.,** Photoluminescent Carbon Dots as Biocompatible Nanoprobes for Targeting Cancer Cells in Vitro. *Journal of Physical Chemistry C*, 114, 28, 12062-12068, **2010a**.
- Li T. L., King J. M., Min D. B.,** Quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in riboflavin photosensitized singlet oxygen oxidation of vitamin D2. *Journal of Food Biochemistry*, 24, 477-492, **2000**.
- Li W., Chen J., Xiang B., An D.,** Simultaneous on-line Dissolution Monitoring of Multicomponent Solid Preparations Containing Vitamins B₁, B₂ And B₆ by a Fiber-Optic Sensor System. *Analytica Chimica Acta*, 408, 39-47, **2000a**.
- Li X., Zhang S., Kulinich S. A., Liu Y., Zeng H.,** Engineering Surface States of Carbon Dots to Achieve Controllable Luminescence for Solid-Luminescent Composites and Sensitive Be²⁺ Detection. *Scientific Reports*, 4, 4976, 1-8, **2014a**.

- Li, T. L., Min, D. B.**, Stability and photochemistry of vitamin D₂ in model system. *Journal of Food Science*, 63, 413-417, **1998**.
- Liang Q., Ma W., Shi Y., Li Z., Yang X.**, Easy Synthesis of Highly Fluorescent Carbon Quantum Dots from Gelatin and their Luminescent Properties and Applications. *Carbon*, 60, 421-428, **2013**.
- Liguori L., Califano R., Albanese D., Raimo F., Crescitelli A., Matteo M.**, Chemical Composition and Antioxidant Properties of Five White Onion (*Allium cepa* L.) Landraces. *Journal of Food Quality*, 1-9, **2017**.
- Lim S. Y., Shen W., Gao Z.**, Carbon Quantum Dots and their Applications. *Chemical Society Reviews*, 44, 1, 362-381, **2014**.
- Lima M. B., Andrade S. I. E., Barreto I. S., Araújo M. C. U.**, Automatic Flow-Batch Approach Using CdTe Quantum Dots for Fluorescent Determination of Ascorbic Acid in Fruit Juices. *Food Analytical Methods*, 7, 8, 1598-1603, **2014**.
- Lima M. B., Barreto I. S., Andrade S. I. E., Almeida L. F., Araújo M. C. U.**, Using Webcam, CdTe Quantum Dots and Flow-Batch System for Automatic Spectrofluorimetric Determination of N-Acetyl-L-cysteine in Pharmaceutical Formulations. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 25, 9, 1638-1646, **2014**.
- Lima, M. B.; Andrade, S. I. E.; Barreto, I. S.; Araújo, M. C. U.**, Automatic Flow-Batch Approach Using CdTe Quantum Dots for Fluorescent Determination of Ascorbic Acid in Fruit Juices. *Food Analytical Methods*, 7, 1598-1603, **2014**.
- Lindquist J., Farroha S. M.**, Application of Differential Pulse Polarography to the Assay of Vitamins. *Analyst*, 100, 1191, 377-385, **1975**.
- Liu C., Zhang P., Zhai X., Tian F., Li W., Yang J., Liu Y., Wang H., Wang W., Liu W.**, Nano-Carrier for Gene Delivery and Bioimaging Based on Carbon Dots with PEI-Passivation Enhanced Fluorescence. *Biomaterials*, 33, 13, 3604- 3613, **2012**.
- Liu Y., Xiao N., Gong N., Wang H., Shi X., Gu W., Ye L.**, One-Step Microwave-Assisted Polyol Synthesis of Green Luminescent Carbon Dots as Optical Nanoprobes. *Carbon*, 68, 258 – 264, **2014**.
- Liu M. L., Chen B. B., Li C. M., Huang C. Z.**, Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. *Green Chemistry*, 3, 21, 449-471, **2019**.
- López-de-Alba P. L., López-Martínez L., Cerdá V., Amador-Hernández J.**, Simultaneous Determination and Classification of Riboflavin, Thiamine, Nicotinamide and Pyridoxine in Pharmaceutical Formulations, by UV-Visible Spectrophotometry and Multivariate Analysis. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 17, 4, 715-722, **2006**.
- Lu W., Gong X., Nan M., Liu Y., Shuang S., Dong C.**, Comparative Study for N and S Doped Carbon Dots: Synthesis, Characterization and Applications for Fe³⁺ Probe and Cellular imaging. *Analytica Chimica Acta*, 898, 116-127, **2015**.
- Lu W., Li Y., Li R., Shuang S., Dong C., Cai Z.**, Facile Synthesis of N-doped Carbon Dots as a New Matrix for Detection of Hydroxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Negative-Ion Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, *ACS Applied Material Interfaces*, 8, 12976-12984, **2016**.
- Lu S., Sui L., Liu J., Zhu S., Chen A., Jin M., Yang B.**, Near-Infrared Photoluminescent Polymer-Carbon Nanodots with Two-Photon Fluorescence. *Advanced Materials*, 29, 15, 1-6, **2017**.

Luo P. G., Sahu S., Yang S. T., Sonkar S. K., Wang J., Wang H., LeCroy G. E., Cao L., Sun Y. P., Carbon “Quantum” Dots for Optical Bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 2116-2127, **2013**.

Luo Y., Miao H., Yang X., Glutathione-Stabilized Cu Nanoclusters as Fluorescent Probes for Sensing pH and Vitamin B1. *Talanta*, 1, 144, 488-95, **2015**.

Machado C. E., Vieira K. O., Ferrari J. L., Schiavon M. A., Pontos Quânticos de Carbono: Síntese Química, Propriedades e Aplicações. *Revista Virtual de Química*, 7, 4, 1306-1346, **2015**.

Mack M., Grill S., Riboflavin Analogs and Inhibitors of Riboflavin Biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 265-275, **2006**.

MacPheson A. M. D., Ottaway J. M., Rapid Determination of Riboflavin in Yeast Preparations by Reaction with Silver Ions. *Analyst*, 103, 830-836, **1978**.

Madrakian T., Maleki S., Gilak S., Afkhami A., Turn-off fluorescence of amino-functionalized carbon quantum dots as effective fluorescent probes for determination of isotretinoin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 247, 428-435, **2017**.

Majumdar S., Bhattacharjee T., Thakur D., Chowdhury D., Carbon Dot Based Fluorescence Sensor for Retinoic Acid. *Chemistry Select*, 3, 2, 673-677, **2018**.

Mao X., Zheng H., Long Y., Du J., Hao J., Wang L., Zhou D., Study on the Fluorescence Characteristics of Carbon Dots. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75, 2, 553-557, **2010**.

Marcano D. C., Kosynkin D. V., Berlin J. M., Sinitskii A., Sun Z., Slesarev A., Alemany L. B., Lu W., Tour J. M., Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano*, 4, 8, 4806-4814, **2010**.

Marchetti M., Ashmead H. D., Tossani N., Marchetti S., Ashmead S. D., Comparison of the Rates of Vitamin Degradation when Mixed with Metal Sulphates or Metal Amino Acid Chelates. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 6, 875-884, **2000**.

Massey, V.; The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochemical Society Transactions*, 4, 28, 283-296, **2000**.

Mata-Granados J.M., Luque D.C., and Quesada J.M., Fully Automated Method for the Determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH) D₃ Hydroxyvitamins, and Vitamins A and E in Human Serum By HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35,3, 575-582, **2004**.

Mattivi F., Monetti A., Vrhovšek U., Tonon D., Andrés-Lacueva C., High-performance Liquid Chromatographic Determination of the Riboflavin Concentration in White Wines for Predicting their Resistance to Light. *Journal of Chromatography A*, 888, 121-127, **2000**.

Mehta V. N., Jha S., Kailasa S., One-Pot Green Synthesis of Carbon Dots by Using Saccharum Officinarum Juice for Fluorescent Imaging of Bacteria (*Escherichia Coli*) and Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) Cells. *Materials Science and Engineering C*, 38, 20–27, **2014**.

Mendonça L. M. V. L., Conceição A., Piedade J., Carvalho V. D., Theodoro V. C. A., Caracterização da Composição Química e do Rendimento dos Resíduos Industriais do Limão Tahiti (*Citrus Latifolia Tanaka*). *Ciência e Tecnologia de alimentos*, 26, 4, 870-874, **2006**.

Merrill A. H., Lambeth J. D., Edmondson D. E., McCormick D. B., Formation and Mode of Action of Flavoproteins. *Annual Review of Nutrition*, 1, 281-317, **1981**.

Miao W., Electrogenated Chemiluminescence and its Biorelated Applications. *Chemical Reviews*, 108, 7, 2506-2553, **2008**.

Miller J.C., Serrato R., Represas-Cardenas J. M., Kundahl G., The Handbook of Nanotechnology: Business, Policy and Intellectual Property Law, 1ed., New Jersey, Wiley, **2005**.

Mirtchev P., Henderson E. J., Soheilnia N., Yip C. M., Ozin G. A., Solution Phase Synthesis of Carbon Quantum Dots as Sensitizers for Nanocrystalline TiO₂ Solar Cells. *Journal of Materials Chemistry*, 4, 22, 1265-1269, **2012**.

Mohamed A. I., Mohamed H. A., Mohamed N. A., El-Zahery M. R., Chemometric Methods for the Simultaneous Determination of Some Water-Soluble Vitamins. *Journal of AOAC International*, 93, 5, 1-15, **2010**.

Mondal T. K., Gupta A., Shaw B. K., Mondal S., Ghorai U. K., Saha S. K., Highly Luminescent N-Doped Carbon Quantum Dots from Lemon Juice With Porphyrin-Like Structures Surrounded By Graphitic Network for Sensing Applications. *RSC Advances*, 6, 6, 59927-59934, **2016**.

Monte-Filho S. S., Lima M. B., Andrade S. I. E., Harding D. P., Fagundes Y. N. M., Santos S. R. B., Lemos S. G., Araújo M. C. U., Flow-Batch Miniaturization. *Talanta*, 86, 208-213, **2011**.

Nagy G., Feher Z., Pungor E., Application of Silicone Rubber-Based Graphite Electrodes for Continuous Flow Measurements: Part II. Voltammetric Study of Active Substances Injected Into Electrolyte Streams. *Analytica Chimica Acta*, 52, 1, 47-54, **1970**.

Neethirajan S., Jayas D. S., Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. *Food Bioprocess Technology*, 4, 39-47, **2011**.

Neto B. B., Scarminio I. S., Bruns R. E., Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria. 4 ed., Porto Alegre, Bookman, **2010**.

Noble D., MS/MS Flexes Its Muscles. *Analytical Chemistry*, 67, 7, 265A-269A, **1995**.

Novoselov K. S., Geim A. K., Morozov S. V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S. V., Grigorieva I. V., Firsiroti A. A., Electric Field Effects in Atomically Thin Carbon Films. *Science*, 306, 5696, 666-669, **2004**.

Oliveira H. P. M., Legendre A. O., Junior, M. A., Gehlen M. H., Transferência de Energia entre Corantes Catiônicos em Sistemas Homogêneos. *Química Nova*, 26, 4, 564-569, **2003**.

Ottaway, P. B., The Technology of Vitamins in Food, 1ed. London; New York, NY: Blackie Academic & Professional, 256p, **1993**.

Paschoalino M. P., Glauciene P. S., Marccone G. P. S., Jardim W. F., Os Nanomateriais e a Questão Ambiental. *Química Nova*, 33, 2, 421-430, **2010**.

Pasquini C., Oliveira W. A., Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium (VI), Ammonia and Phosphorus. *Analytical Chemistry*, 57, 2575-2579, **1985**.

Pavoni J. F., Neves-Junior W. F. P., Spiropoulos D. B., Araújo D. B., Uma montagem experimental para a medida de fluorescência (An experimental setup for fluorescence measurement). *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 36, 4, 4501- 4509, **2014**.

Peng H., Travas-Sejdic J., Simple Aqueous Solution Route to Luminescent Carbogenic Dots from Carbohydrates. *Chemistry of Materials*, 21, 23, 5563-5565, **2009**.

- Penniston K. L., Nakada S. Y., Holmes R. P., Assimos D. G.,** Quantitative Assessment of Citric Acid in Lemon Juice, Lime Juice, and Commercially-Available Fruit Juice Products. *Journal of Endourology*, 22, 3, **2008**.
- Pereira A. S., Bicalho B., Lilla S., Nucci G.,** Desafios da Química Analítica Frente às Necessidades da Indústria Farmacêutica. *Química Nova*, 28, S107-S111, **2005**.
- Petteys B. J., Frank E. L.,** Rapid Determination of Vitamin B2 (Riboflavin) in Plasma by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, 412, 38–43, **2011**.
- Phillips D. A., Joseph C. M., Yang G., Martínez-Romero E., Sanborn J. R., Volpin H.,** Identification of Lumichrome as a Sinorhizobium Enhancer of Alfalfa Root Respiration and Shoot Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS*, 96, 22, 12275-12280, **1999**.
- Pirsaheb M., Moradi S., Shahlaei M., Farhadian N.,** Application of carbon dots as efficient catalyst for the green oxidation of phenol: Kinetic study of the degradation and optimization using response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 353, 5, 444-453, **2018**.
- Piro A., Tagarelli G., Lagonia P., Tagarelli A., Quattrone A.,** Casimir Funk: His Discovery of the Vitamins and Their Deficiency Disorders. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 57, 2, 85-88, **2010**.
- Pitkin R. M.,** (Editor), Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. The National Academy of sciences, Washington, DC: The National Academies Press, 592p., **1998**.
- Povie G., Segawa Y., Nishihara T., Miyauchi Y., Itami K.,** Synthesis of a Carbon Nanobelt. *Science*, 356, 172–175, **2017**.
- Powers H. J., Hill M. H., Mushtaq S., Dainty J. R., Majsak-Newman G., Williams E. A.,** Correcting a marginal riboflavin deficiency improves hematologic status in young women in the United Kingdom. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 1274–1284, **2011**.
- Powers H. J.,** Riboflavin (vitamin B-2) and health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1352-1360, **2003**.
- Pozdrik R., Roddick F. A., Rogers P. J., Nguyen T.,** Spectrophotometric, method for exploring 3-methyl-2-butene-1-thiol (MBT) formation in lager. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54,17, 6123–6129, **2006**.
- Poznyak S. K., Talapin D. V., Schevchenko E. V., Weller H.,** Quantum Dot Chemiluminescence. *Nano Letters*, 4, 4, 693-698, **2004**.
- Proinsias K. Ó., Giedyk M., Gryko D.,** Vitamin B12: Chemical Modifications. *Chemical Society Reviews*, 42, 16, 6605-6619, **2013**.
- Purbia R., Paria S.,** A Simple Turn On Fluorescent Sensor for the Selective Detection of Thiamine Using Coconut Water Derived Luminescent Carbon Dots. *Biosensors and Bioelectronic*, 79, 467-75, **2016**.
- Qijin W., Nianjun Y., Haili Z., Xinpin Z., Bin X.,** Voltammetric Behavior of Vitamin B₂ on the Gold Electrode Modified With A Self-Assembled Monolayer Of L-Cysteine And Its Application For the Determination of Vitamin B₂ Using Linear Sweep Stripping Voltammetry. *Talanta*, 55, 459-467, **2001**.
- Qu D., Zheng M., Zhang L., Zhao H., Xie Z., Jing X., Haddad R. E., Fan H., Sun Z.,** Formation Mechanism and Optimization of Highly Luminescent N-Doped Graphene Quantum Dots. *Scientific Reports*, 4, 5294, (1-11), **2014**.

Qu X., Alvarez P. J. J., Li Q., Applications of Nanotechnology in Water and Wastewater Treatment. *Water Research*, 47, 3931-3946, **2013**.

Rashidi L., Khosravi-Darani K., The Applications of Nanotechnology in Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 723–730, **2011**.

Ray S. C., Saha A., Jana N. R., Sarkar R., Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application. *Journal of Physical Chemistry C*, 113, 43, 18546 – 18551, **2009**.

Reillon V., Berthier S., Andraud C., Optical properties of lustred ceramics: complete modelling of the actual structure. *Applied Physics A, Materials Science & Processing*, 100, 901-910, **2010**.

Reis B. F., Giné M. F., Zagatto E. A. G., Lima J. L. F. C., Lapa R. A., Multicommutation in Flow Analysis. Part 1. Binary Sampling: Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plant Digests. *Analytica Chimica Acta*, 293, 129-138, **1994**.

Ribeiro D. O., Pinto D. C., Lima L. M. T. R., Volpato N. M., Cabral L. M., Sousa V. P., Chemical Stability Study of Vitamins Thiamine, Riboflavin, Pyridoxine and Ascorbic Acid in Parenteral Nutrition for Neonatal use. *Nutrition Journal*, 10, 47, **2011**.

Riebe M. T., Eustace D. J., Process Analytical Chemistry, an industrial perspective. *Analytical Chemistry*, 62, 2, 65A-71A, **1990**.

Riggs J. E., Guo Z., Carroll D. L., Sun Y., Strong Luminescence of Solubilized Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 24, 5879-5880, **2000**.

Rocha F. R. P., Filho O. F., Reis B. F., A multicommutated flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations. *Talanta*, 59, 191-200, **2003**.

Roco M. C., Mirkin C. A., Hersam M. C., Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020: Summary of International Study. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 897–919, **2011**.

Rosa N. A., Afonso J. C., A Química da Cerveja. *Química Nova na Escola*, 37, 2, 98-105, **2015**.

Rose J., Gibbons K., Carlson S. E., Winston W. K., Nutrient Needs of the preterm Infant. *Nutrition in Clinical Practice*, 8, 5, 226 – 232, **1993**.

Ruzicka J., Marshall G. D., Sequential Injection: A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays. *Analytica Chimica Acta*, 237, 329-343, **1990**.

Ruzicka J.; Hansen E. H.; Flow Injection Analysis, Wiley Interscience, New York, **1988**.

Ruzicka J.; Hansen E. H.; Flow injection analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 78, 145-157, **1975**.

Sa E., Silva P. S., Jost C. L., Spinelli A., Electrochemical Sensor Based on Bismuth-film Electrode for Voltammetric Studies on Vitamin B₂ (riboflavin). *Sensors and Actuators B Chemical*, 209, 1-40, **2015**.

Sahu S., Behera B., Maiti T. K., Mohapatra S., Simple One-Step Synthesis of Highly Carbon Dots From Orange Juice: Application as Excellent Bio-Imaging Agents. *Chemical Communications*, 48, 8835-8837, **2012**.

Salveti S., Celandroni F., Ghelardi E., Baggiani A., Senesi S., Rapid Determination of Vitamin B₂ Secretion by Bacteria Growing on Solid Media. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1255-1260, **2003**.

Santos J. L., Rocha G. P., Alves R. B., Freitas, R. P. Fulereno: Química e Aplicações. Química Nova, 33, 3, 680-693, **2010**.

Sapsford K. E., Berti L., Medintz I. L., Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations. Angewandte Chemie (International Edition in English), 45, 28, 4562-4589, **2006**.

Sarswat P. K., Free M. L., Light Emitting Diodes Based on Carbon Dots Derived from Food, Beverage, and Combustion Wastes. Physical Chemistry Chemical Physics, 17, 27642-27652, **2015**.

Schaming D., Remita H., Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. Foundations of Chemistry, 17, 3, 187-205, **2015**.

Scott M. L., Hill F. W., Norris L. C., Hettser G. F., Chemical Determination of Riboflavin. Journal of Biological Chemistry, 165, 65-71, **1946**.

Shamsipur M., Molaei K., Molaabasi F., Alipour M., Alizadeh N., Hosseinkhani S., Hosseini M., Facile Preparation and Characterization of New Green Emitting Carbon Dots for Sensitive and Selective off/on Detection of Fe³⁺ Ion and Ascorbic Acid in Water and Urine Samples and Intracellular Imaging in Living Cells. Talanta, 183, 1, 122-130, **2018**.

Shamsipur M., Barati A., Taherpour A. A., Jamshidi M., Resolving the Multiple Emission Centers in Carbon Dots: From Fluorophore Molecular States to Aromatic Domain States and to Carbon-core States. The Journal of Physical Chemistry Letters, 9, 15, 4189-4198, **2018a**.

Sharon, M.; Sharon, M., Nanographene and Carbon Quantum Dots (C-Dots). In: Graphene: An Introduction to the Fundamentals and Industrial Applications, John Wiley & Sons, 3, 39-72, **2015**.

Sharma V., Tiwari P., Mobin S. K., Sustainable Carbon-Dots: Recent Advances in Green Carbon Dots for Sensing and Bioimaging. Journal of Materials Chemistry B, 5, 8904-8924, **2017**.

Sharpless K., Margolis S. T. J., Determination of Vitamins in Food-Matrix Standard Reference Materials. Journal of Chromatography A, 881, 171-181, **2000**.

Shen J., Shang S., Chen X., Wang D., Cai Y., Highly fluorescent N, S-co-Doped Carbon Dots and their Potential Applications as Antioxidants and Sensitive Probes for Cr (VI) Detection. Sensors and Actuators B: Chemical, 248, 92-100, **2017**.

Sheraz M. A., Kazi S. H., Ahmed S., Qadeer K., Khan M. F., Ahmad I., Multicomponent Spectrometric Analysis of Riboflavin and Photoproducts and Their Kinetic Applications. Central European Journal of Chemistry, 12, 6, 635-642, **2014**.

Sherman J., The Theoretical Derivation of Fluorescent x-ray Intensities from Mixtures. Spectrochimica Acta, 7, 283-306, **1955**.

Shi H., Wei J., Qiang L., Chen X., Meng X., Fluorescent Carbon Dots for Bioimaging and Biosensing Applications. Journal of Biomedical Nanotechnology, 10, 2677–2699, **2014**.

Shi J., Ni G., Jinchun Tu J., Jin X., Peng J., Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots for Sensitive Detection of Fe²⁺ and Hydrogen Peroxide. Journal of Nanoparticle Research, 19, 6, **2017**.

Silva F. O., Viol L. C. S., Ferreira D. L., Alves J. L. A., Schiavon M. A., O Estado da Arte da Síntese de Semicondutores Nanocristalinos Coloidais. Química Nova, 33, 9, 1933-1939, **2010**.

Silva J. C. G. E., Gonçalves S. H. M. R., Analytical and Bioanalytical Applications of Carbon Dots. Trends in Analytical Chemistry, 30, 1327-1336, **2011**.

Sim H., Kim B., Lee J., A Systematic Approach for The Determination of B-Group Vitamins in Multivitamin Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry, Journal of AOAC International, 99, 1223–1232, **2016**.

Singh R. K., Kumar R., Singh D. P., Graphene oxide: Strategies for Synthesis, Reduction and Frontier Applications. RSC Advances, 6, 64993-65011, **2016**.

Sitko R.; Beata Z., Quantification in X-Ray Fluorescence Spectrometry. In: SHARMA, S. K. X-Ray Spectroscopy. [S.l.]: InTech, Cap. 8, p. 137-162, **2011**.

Skeggs L. T. J., An Automatic Method for Colorimetric Analysis. American Journal of Clinical Pathology, 28, 3, 311-322, **1957**.

Skoog, West, Holler, Crouch, Fundamentos de Química Analítica, 8 ed., Editora Thomson, São Paulo - SP, **2006**.

Sleiman M., Veturini Filho W.G., Ducotti C., Nojimoto T., Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica. Ciência e Agrotecnologia, 34, 163-172, **2010**.

Snell E. E., Strong F. M., A Microbiological Assay for Riboflavin. Industrial And Engineering Chemistry - Analytical Edition, 11, 6, 346-350, **1939**.

Song Y., Zhu S., Xiang S., Zhao X., Zhang J., Zhang H., Fu Y., Yang B., Investigation into the Fluorescence Quenching Behaviors and Applications of Carbon Dots. Nanoscale, 9, 6, 4676-4682, **2014**.

Sotomayor M. D. P. T., Dias I. L. T., Lanza M. R. V., Moreira A. B., Kubota L. T., Aplicações e Avanços da Espectroscopia de Luminescência em Análises Farmacêuticas. Química Nova, 31, 7, 1755-1774, **2008**.

Staden J. F. V., Analytical Continuous Flow Systems. Where Two Worlds Collide! from Gravimetry and Test Tubes to Flow Systems to Fia to Sia to Pat and From Orsat to Control Room to Pat to Tap. Revue Roumaine de Chimie, 60, 5-6, 403-414, **2015**.

StatNano, 2018. Disponível em: <<https://statnano.com/report/s29>>. Acesso em: Dezembro de **2018**.

Stewart K. K., Beecher G. R., Hare P. E., Rapid Analysis of Discrete Samples: The use of Nonsegmented, Continuous Flow. Analytical Biochemistry, 70, 1, 167-173, **1976**.

Suhara Y., Kamao H., Tsugawa N., Okano T., Method for the Determination of Vitamin K Homologues in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 77, 757–763, **2005**.

Sun C., Zhangn Y., Wang P., Yang Y., Wang Y., Xu J., Wang Y., Yu W. W., Synthesis of Nitrogen and Sulfur Co-Doped Carbon Dots from Garlic for Selective Detection of Fe³⁺. Nanoscale Research Letters, 11, 110, 1-9, **2016**.

Sun D., Ban R., Zhang P., Wu G., Zhang J., Zhu J., Hair Fiber as a Precursor for Synthesizing of Sulfur and Nitrogen-Co-Doped Carbon Dots with Tunable Luminescence Properties. Carbon, 64, 424–434, **2013**.

Sun W., Du Y., Wang Y., Study on Fluorescence Properties of Carbogenic Nanoparticles and their Application for the Determination of Ferrous Succinate. Journal of Luminescence, 130, 1463-1469, **2010**.

Sun X., Lei Y., Fluorescent Carbon Dots and Their Sensing Applications. *Trends in Analytical Chemistry* 163–180, **2017**.

Sun Y. P., Zhou B.; Lin Y.; Wang W.; Fernando K. A. S.; Pathak P.; Meziani M. J.; Harruff B. A.; Wang X.; Wang H.; Luo P. G.; Yang H.; Kose M. E.; Chen B.; Veca L. M.; Xie S. Y., Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 7756-7757, **2006**.

Takami Y., Gong H., Amemiya T., Riboflavin Deficiency Induces Ocular Surface Damage. *Ophthalmic Research*, 36, 156–165, **2004**.

Tamer I. M., Özilgen M., Ungan S., Kinetics of Riboflavin Production, by Brewers' Yeasts. *Enzyme Microbiology Technology*, 10,754–756, **1988**.

Thiex N. J., Manson H., Anderson S., Person J., Determination of Crude Protein in Animal Feed, Forage, Grain, and Oilseeds by Using Block Digestion with a Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 85, 2, 309-317, **2002**.

Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R., Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *International Union of Pure and Applied Chemistry* 74, 835-855, **2002**.

Thompson R. Q., Ghadiali M., Microwave Drying of Precipitates for Gravimetric Analysis. *Journal of Chemical Education*, 70, 2, 170-171, **1993**.

Tian T., He Y., Ge Y., Song G., One-Pot Synthesis of Boron and Nitrogen Co-Doped Carbon Dots as the Fluorescence Probe for Dopamine Based on the Redox Reaction Between Cr(VI) and Dopamine. *Sensors and Actuators B Chemical*, 240, 1265–1271, **2017**.

Tripathi K. M., Sonker A. K., Sonkar S. K., Sarkar S., Pollutant Soot of Diesel Engine Exhaust Transformed to Carbon Dots for Multicoloured Imaging of E. Coli and Sensing Cholesterol. *RSC Advances*, 4, 30100–30107, **2014**.

Trojanowicz M., (editor). *Advances in Flow Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH. **2008**.

Tyagi A., Tripathi K. M., Singh N., Choudhary S., Gupta R. K., Green Synthesis of Carbon Quantum Dots from Lemon Peel Waste: Applications in Sensing and Photocatalysis. *RSC Advances*, 76, 6, 72423-72432, **2016**.

Vandarkuzhali S. A. A., Jeyalakshmi V., Sivaraman G., Singaravadiel S., Krishnamurthy K. R., Viswanathan B., Highly Fluorescent Carbon Dots from Pseudo-Stem of Banana Plant: Applications as Nanosensor and Bio-Imaging Agents. *Sensors and Actuators B*, 252, 894-900, **2017**.

Vaz R., Vieira K. O., Machado C. E., Ferrari J. L., Schiavon M. A., Preparação de Pontos de Carbono e Sua Caracterização Óptica: Um Experimento para Introduzir Nanociência na Graduação. *Química Nova*, 38, 10, 1366-1373, **2015**.

Viñas P., Balsalobre N., López-Erroz C., Hernández-Córdoba M., Liquid Chromatographic Analysis of Riboflavin Vitamers in Foods Using Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1789-1794, **2004**.

Voigt M. N., Eitenmiller R. R., Microbiological assays. In J. Augustin B. K., Becker D., Venugopal P. B., (Ed.). *Methods of Vitamin Assay*, New York: John Wiley & Sons, Inc., 43-63, **1985**.

Walsh M. C., Moving from Official to Traceable Methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 616-623, **1999**.

Wang Q., Li H., Chen L. Q., Huang X. J., Monodispersed Hard Carbon Spherules with Uniform Nanopores. *Carbon*, 39, 14, 2211-2214, **2001**.

Wang F., Pang S., Wang L., Li Q., Kreiter M., Liu C., One-Step Synthesis of Highly Luminescent Carbon Dots in Noncoordinating Solvents. *Chemistry of Materials*, 22,16, 4528-4530, **2010**.

Wang F., Kreiter M., He B., Panga S., Liu C., Synthesis of Direct White-Light Emitting Carbogenic Quantum Dots. *Chemical Communications*, 19, 46, 3309-3311, **2010a**.

Wang X., Cao L., Yang S., Lu F., Meziani M. J., Tian L., Sun K. W., Bloodgood M. A., Sun Y., Bandgap-Like Strong Fluorescence in Functionalized Carbon Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 5310-5314, **2010b**.

Wang Y., Bao L., Liu Z., Pang D., Aptamer Biosensor Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer from Upconverting Phosphors to Carbon Nanoparticles for Thrombin Detection in Human Plasma. *Analytical Chemistry*, 83, 21, 8130-8137, **2011a**.

Wang X., Qu K., Xu B., Ren J., Qu X., Multicolor Luminescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Supramolecular Assembly with Porphyrin, Intrinsic Peroxidase-Like Catalytic Activity and Applications. *Nano Research*, 4, 9, 908-920, **2011b**.

Wang Q., Liu X., Zhang L., Lv Y., Microwave-Assisted Synthesis of Carbon Nanodots Through an Eggshell Membrane and Their Fluorescent Application. *Analyst*, 137, 5392-5397, **2012**.

Wang R., Li G., Dong Y., Chi Y., Chen G., Carbon Quantum Dot-Functionalized Aerogels for NO₂ Gas Sensing. *Analytical Chemistry*, 85, 8065–8069, **2013**.

Wang P., Yin Y. M., Eremin S. A., Rybakov V. B., Zhang T. C., Xu Z. H., Ren L. L., He X. D., Meng M., Xi R. M., Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Vitamin B2 in Foods and Pharmaceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7048–7054, **2013**.

Wang C., Wu W., Periasamy A. P., Chang H., Electrochemical Synthesis of Photoluminescent Carbon Nanodots from Glycine for Highly Sensitive Detection of Hemoglobin. *Green Chemistry*, 5, 16, 2509-2514, **2014**.

Wang Y., Hu A., Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 2, 6921–6939, **2014**.

Wang L., Zhou H. S., Green Synthesis of Luminescent Nitrogen-Doped Carbon Dots from Milk and Its Imaging Application. *Analytical Chemistry*, 86, 18, 8902-8905, **2014**.

Wang Z., Dai Z., Carbon Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: an Overview. *Nanoscale*, 7, 6420–6431, **2015**.

Wang J., Su S., Wei J., Bahgi R., Hope-Weeks L., Qiu J., Wang S., Ratio-Metric Sensor to Detect Riboflavin via Fluorescence Resonance Energy Transfer with Ultrahigh Sensitivity. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 72, 17–24, **2015a**.

Wang J., Wei J., Su S., Qiu J., Novel Fluorescence Resonance Energy Transfer Optical Sensors for Vitamin B12 Detection Using Thermally Reduced Carbon Dots. *New Journal of Chemistry*, 39, 501-507, **2015b**.

Wang F., Wang S., Sun Z., Zhu H., Study on Ultrasonic Single-Step Synthesis and Optical Properties of Nitrogen-Doped Carbon Fluorescent Quantum Dots. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 23, 769–776, **2015c**.

Wang W., Lu Y., Huang H., Wang J., Chen J., Feng J., Facile Synthesis of N, S-Codoped Fluorescent Carbon Nanodots for Fluorescent Resonance Energy Transfer Recognition of Methotrexate with High Sensitivity and Selectivity. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 517-522, **2015d**.

Wang T., Chen C., Wang C., Tan Y. Z., Liao W., Multicolor Functional Carbon Dots via One-Step Refluxing Synthesis. *ACS Sensors*, 2, 3, 354–363, **2017**.

Wei J., Qiu J., Unveil the Fluorescence of Carbon Quantum Dots. *Advanced Engineering Materials*, 1-5, **2014**.

Wei W., Xu C., Wu L., Wang J., Ren J., Qu X., Non-Enzymatic-Browning-Reaction: A Versatile Route for Production of Nitrogen-Doped Carbon Dots With Tunable Multicolor Luminescent Display. *Scientific Reports*, 4, 3564-3571, **2014**.

Willard H. H.; Merritt L. L. J., Dean J. A., Settle F. A. J., Instrumental Methods of Analysis. Belmont: Wadsworth, 108-781, **1981**.

Williams A. T. R., Winfield S. A., Relative Fluorescence Quantum Yields Using a Computer-controlled Luminescence Spectrometer. *Analyst*, 108, 1067-1071, **1983**.

Workman J., Mel Koch M., Veltkamp D., Process Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry* 79, 12, 4345–4364, **2007**.

Wu L., Luderer M., Yang X., Swain C., Zhang H., Nelson K., Stacy A. J., Shen B., Lanza G. M., Pan D., Surface Passivation of Carbon Nanoparticles With Branched Macromolecules Influences Near Infrared Bioimaging. *Theranostics*, 3, 9, 677–686, **2013**.

Xu H., Yang X., Li G., Zhao C., Liao X., Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots for Selective Detection of Tartrazine in Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 30, 6707-6714, **2015a**.

Xu Q., Zhou Q., Hua Z., Xue Q., Zhang C., Wang X., Pan D., Xiao M., Single-Particle Spectroscopic Measurements of Fluorescent Graphene Quantum Dots. *ACS Nano*, 7, 12, 10654-10661, **2013**.

Xu Y., Liu J., Gao C., Wang E., Applications of Carbon Quantum Dots In Electrochemiluminescence: A Mini Review. *Electrochemical Communications*, 48, 151-154, **2014**.

Yan Z., Zhang Z., Chen J., Biomass-based carbon dots: Synthesis and application in imatinib determination, *Sens. Actuat. B: Chem* 225, 469-473, **2016**.

Yang H., Ratnac K. R., Ringer S. P., Thordarson P., Gooding J. J., Braet F. Carbon Nanomaterials in Biosensors: Should You use Nanotubes or Graphene? *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 12, 2114-2138, **2010**.

Yang S., Sun J., Li X., Zhou W., Wang Z., He P., Ding G., Xie, X., Kang, Z., Jiang M., Large-scale Fabrication of Heavy Doped Carbon Quantum Dots With Tunable-photoluminescence and Sensitive Fluorescence Detection. *Journal of Materials Chemistry A*, 2, 23, 8660-8667, **2014**.

Yang S., Wang X., Wang H., Lu F., Luo P.G., Cao L., Mezzani M. J.; Liu, J., Liu, Y.; Chen, M.; Huang, Y.; Sun, Y., Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *Journal of Physical Chemistry C*, 113, 42, 18110-18114, **2009**.

Yao W., Wu N., Lin Z., Chen J., Li S., Weng S., Zhang L., Liu A., Lin X., Fluorescent Turn-Off Competitive Immunoassay for Biotin Based on Hydrothermally Synthesized Carbon Dots. *Microchimica Acta*, 184, 3, 907-914, **2017**.

Yong K. T., Swihart M. T., In Vivo Toxicity of Quantum Dots: No Cause for Concern? *Nanomedicine*, 7, 11, 1641–1643, **2012**.

- Yu C., Li X., Zeng F., Zheng F., Wu S.**, Carbon-dot-based Ratiometric Fluorescent Sensor for Detecting Hydrogen Sulfide in Aqueous Media and Inside Live Cells, *Chemical Communications*, 49, 403-405, **2013**.
- Yuan F., Yuan T., Sui L., Wang Z., Xi Z., Li Y., Li X., Fan L., Tan Z., Chen A., Jin M., Yang S.**, Engineering triangular carbon quantum dots with unprecedented narrow bandwidth emission for multicolored LEDs. *Nature Communications*, 9, 2249, **2018**.
- Zagatto E. A. G., Staden J.F.V., Maniasso N., Stefan R.I., Marshall G.D.**, Information Essential for Characterizing a Flow-Based Analytical System. *Pure and Applied Chemistry* 74, 4, 585-592, **2002**.
- Zagatto E. A., Oliveira C. C., Collins C. H.**, Classificação e Definição dos Métodos de Análises em Fluxo (Recomendações - Iupac 1994). *Química Nova*, 22, 1, 143-146, **1999**.
- Zarbin J. G., Oliveira M. M.**, Nanoestruturas de Carbono (Nanotubos, Grafeno): Quo Vadis? *Química Nova*, Vol. 36, No. 10, 1533-1539, **2013**.
- Zempleni J., Rucker R. B., McCornick D. B., Suttie J. W.**, (Editors), *Handbook of vitamins*. CRC Press, New York 4ed. 608p., **2006**.
- Zhai X., Zhang P., Changjun Liu C., Bai T., Li W., Daic L., Liu W.**, Highly Luminescent Carbon Nanodots by Microwave-Assisted Pyrolysis. *Chemical Communications*, 48, 7955-7957, **2012**.
- Zhang J., Shen W., Pan D., Zhang Z., Fang Y., Wu M.**, Controlled Synthesis of Green and Blue Luminescent Carbon Nanoparticles With High Yields by the Carbonization of Sucrose. *New Journal of Chemistry*, 34, 591-593, **2010**.
- Zhang W., Zhu S., Luque R., Han S., Hu L., Xu G.**, Development of Carbon Electrode Materials and Their Bioanalytical and Environmental Applications. *Chemical Society Reviews*, 45, 715-752, **2016**.
- Zhao S., Lan M., Zhu X., Xue H., Ng T., Meng X., Lee C., Wang P., Zhang W.**, Green Synthesis of Bifunctional Fluorescent Carbon Dots from Garlic for Cellular Imaging and Free Radical Scavenging. *Applied Materials & Interfaces*, 7, 31, 17054-17060, **2015**.
- Zheng M., Xie Z., Qu D., Li D., Du P., Jing X., Sun Z.**, On-Off-On Fluorescent Carbon Dot Nanosensor for Recognition of Chromium(VI) and Ascorbic Acid Based on the Inner Filter Effect. *Applied Materials and Interfaces*, 5, 24, 13242-13247, **2013**.
- Zhou J., Booker C., Li R., Zhou X., T. Sham, Sun X., Ding Z.**, An Electrochemical Avenue to Blue Luminescent Nanocrystals from Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNTs). *Journal of the American Chemical Society*, 129, 4, 744-745, **2007**.
- Zhu A., Qu Q., Shao X., Kong B., Tian Y.**, Carbon-Dot-Based Dual-Emission Nanohybrid Produces a Ratiometric Fluorescent Sensor for In Vivo Imaging of Cellular Copper Ions. *Angewandte Chemie International Edition*, 51, 1-6, **2012**.
- Zhu S., Song Y., Zhao X., Shao J., Zhang J., Yang B.**, The Photoluminescence Mechanism in Carbon Dots (Graphene Quantum Dots, Carbon Nanodots, and Polymer Dots): Current State and Future Perspective. *Nano Research*, 8, 2, 355-381, **2015**.
- Ziegler J. A.**, Photochemical Destruction of Vitamin B₂ in Milk. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 6, 1039-1040, **1944**.

Zong J., Yang X., Trinchì A., Hardin S., Cole I., Zhu Y., Li C., Muster T., Wei G., Carbon Dots as Fluorescent Probes for “Off–On” Detection of Cu²⁺ and L-Cysteine in Aqueous Solution. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 330-335, **2014**.

Zuo P., Gao J., Peng J., Liu J., Zhao M., Zhao J., Zuo P., He H., A Sol-Gel Based Molecular Imprint Incorporating Carbon Dots for Fluorometric Determination of Nicotinic Acid. *Microchimica Acta*, 183, 1, 329–33, **2016**.

ANEXO: Produção científica

Artigo Publicado

Ao longo do curso de doutorado em Química, área de concentração: Química Analítica, foi publicado um artigo científico relacionado com o trabalho e que permitiu o desenvolvimento efetivo da presente tese.

Journal of Pharmaceutical Analysis xxx (xxxx) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com



Synthesis of highly fluorescent carbon dots from lemon and onion juices for determination of riboflavin in multivitamin/mineral supplements

Severino S. Monte-Filho^a, Stefani I.E. Andrade^a, Marcelo B. Lima^b, Mario C.U. Araujo^{a,*}

^a Universidade Federal da Paraíba, CCEN, Departamento de Química, P.O. Box 5093, Zip Code 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil

^b Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Serra Talhada, UAST, Zip Code 56909-535, Serra Talhada, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2018

Received in revised form 19 February 2019

Accepted 20 February 2019

Available online xxx

Keywords:

Carbon dots

Microwave-assisted carbonization

Lemon-onion juice

Riboflavin

Multivitamin/mineral supplements

Fluorescence

ABSTRACT

In this work, lemon and onion biomasses commonly found in street markets are for the first time used to develop a facile, fast and low-cost one-step microwave-assisted carbonization method for synthesis of highly fluorescent carbon dots (CDs). The structure and optical properties of CDs were investigated by TEM, XRD, XRF, UV-Vis, FTIR, and fluorescence spectroscopy. CDs displayed satisfactory optical properties, a high quantum yield of 23.6%, excellent water solubility and the particle size was 4.23–8.22 nm with an average diameter of 6.15 nm. An efficient fluorescent resonance energy transfer (FRET) between the CDs and riboflavin was achieved with CDs acting as donor and riboflavin as acceptor. A linear relationship between FRET and the riboflavin concentration from 0.10 to 3.0 µg/mL was observed, allowing the development of an accurate and fast analytical method to determine this vitamin in multivitamin/mineral supplements. Despite the potential interferences in these supplements, CDs were selective for riboflavin under optimized conditions. A paired *t*-test at a 95% confidence level indicated no statistically significant difference between the proposed and the reference methods. Recovery test presented values ranged from 96.0% to 101.4%. The limit of detection and relative standard deviation were estimated at 1.0 ng/mL and <2.6% (*n*=3), respectively. CDs were successfully synthesized in a domestic microwave oven (1450 W, 6 min), presenting satisfactory parameters when compared with results of other studies reported in the literature, suggesting that the proposed method is a potentially useful method for the synthesis of CDs and determination of riboflavin.

© 2019.

1. Introduction

There is a promising interest in technological research involving the replacement of photoluminescent organic dyes by semiconductor or carbon nanomaterials [1]. These studies aim at the development of innovative analytical technologies, based on their optical properties with applications to several areas of knowledge, such as biology, physics, and chemistry. Fluorescent carbon dots (CDs) are promising for this purpose, when compared to their direct competitors, semiconductor quantum dots (QDs) [2,3]. CDs have already been recognized as being less cytotoxic, highly biocompatible, as well as presenting less complex aqueous synthesis routes and a high fluorescence quantum yield [1,4–9].

CDs doped with heteroatoms, especially N and S, provide an efficient method to enhance their fluorescent properties including high quantum yield, and to tune their electronic and chemical properties [7,10–17]. For instance, Wang et al. [14] employed citric acid and cysteine to fabricate CDs with a quantum yield of 42.7% using a hydrothermal treatment. Duan et al. [7] used ethylenediamine as the carbon source and sulfamic acid as the surface passivation agent to prepare CDs with a quantum yield of 28%. As another example, Chen et al. [17] employed hydrothermal treatment of garlic to prepare CDs with a quantum yield of 13%, suggesting this could be an alternative

for sources of carbon and surface passivation agents with heteroatoms.

Nowadays, many efforts have been spent on the development of new strategies for synthesis and doping of CDs. Different physical and chemical methods, such as hydrothermal treatment, laser ablation, electrochemical oxidation and microwave treatment have been presented in the literature [4–7]. In general, the hydrothermal approach has been employed in many studies for CDs synthesis using various natural resources, such as leaves, fruits, grains, seeds, even beverages such as beer, coffee, milk, and tea [1,8,9].

Other innovative research has been on the facile and rapid microwave treatment approach for the preparation of CDs from different precursors, such as hydrocarbons, carboxylic acids, esters, and biomass residues [1,7,8]. Microwave-assisted synthesis provides benefits such as simplicity, low-cost and a short reaction time thus avoiding traditional harsh conditions such as strong acids, high temperatures, and long reaction times [1].

Riboflavin, commonly known as vitamin B₂, is one of the water-soluble vitamins that play a crucial role in functioning healthy humans. It is also required for a wide variety of cellular processes, such as metabolism of fats, ketone bodies, carbohydrates, proteins, nucleic acid repair process, cell apoptosis and electron transfer processes in the respiratory chain [14,18]. Although riboflavin is found in many foods, such as milk and dairy products, meat, eggs, livers, cereals and fresh leafy vegetables [18], diets lacking this vitamin caused lesions of the muco-cutaneous surfaces, intense photophobia, fatigue, slowed

* Corresponding author.

Email address: laqa@quimica.ufpb.br (M.C.U. Araujo)